

530, 207

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

04 APR 2005

(43) 国際公開日  
2004 年 4 月 15 日 (15.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/031385 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/09, 1/15,  
1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012734

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 3 日 (03.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-292853 2002 年 10 月 4 日 (04.10.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 麒麟  
麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)  
[JP/JP]; 〒104-8288 東京都中央区新川二丁目10番  
1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 押村 光雄 (OS-  
HIMURA, Mitsuo) [JP/JP]; 〒683-8503 鳥取県米子市  
西町86 鳥取大学大学院医学系研究科内 Tottori (JP).  
加藤 基伸 (KATO, Motonobu) [JP/JP]; 〒683-8503 鳥  
取県米子市西町86 鳥取大学大学院医学系研究科内  
Tottori (JP). 富塚 一磨 (TOMIZUKA, Kazuma) [JP/JP];  
〒370-1295 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒  
株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP). 黒岩 義巳  
(KUROIWA, Yoshimi) [JP/JP]; 〒370-1295 群馬県高崎  
市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP). 掛田 実 (KAKEDA, Minoru) [JP/JP]; 〒  
370-1295 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式  
会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP).(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒  
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5  
森ビル3階 Tokyo (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HUMAN ARTIFICIAL CHROMOSOME (HAC) VECTOR

(54) 発明の名称: ヒト人工染色体 (HAC) ベクター

(57) Abstract: A human artificial chromosome (HAC) vector and a method of constructing the same; a method of transferring a  
foreign DNA and a method of constructing cells expressing a foreign DNA by using the human artificial chromosome vector; and a  
process for producing a protein.(57) 要約: 本発明は、ヒト人工染色体 (HAC) ベクター及びその作製方法に関する。また本発明は、ヒト人工  
染色体ベクターを用いた外来 DNA の導入方法及び外来 DNA 発現細胞の作製方法に関する。さらに本発明は、タン  
パク質の製造方法に関する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/031385 A1

## 明 細 書

## ヒト人工染色体（HAC）ベクター

5      技術分野

本発明は、ヒト人工染色体（HAC）ベクター及びその作製方法に関する。また本発明は、ヒト人工染色体ベクターを用いた外来DNAの導入方法及び外来DNA発現細胞の作製方法に関する。さらに本発明は、タンパク質の製造方法に関する。

10

背景技術

哺乳動物細胞に外来遺伝子を導入発現させるためのベクターは、基礎生命科学研究において必須のツールであるばかりでなく、その成果の産業（例：医薬品の大量生産）や医療（例：遺伝子治療）における実用化の際に重要な役割を果たしてきた。1970年代後半以降の遺伝子工学技術の進展は、大腸菌や酵母における特定の遺伝子DNA断片の単離と増幅（遺伝子クローニング）を容易にした。従来、哺乳動物細胞への遺伝子導入には、クローン化DNAが用いられてきた。実際には、発現させたい遺伝子（cDNA）のコード領域に哺乳動物細胞で機能し得るプロモーターやポリA付加部位などを連結した人工的な発現ユニットを作製するか、あるいはコード領域に加えて、本来のプロモーターやポリA付加部位等を含むゲノムDNA断片などを含む、大腸菌のプラスミド（最長20kb程度：環状）、コスミド（最長40kb程度：環状）、細菌人工染色体（BAC；最長200kb：環状）、酵母人工染色体（YAC；最長1Mb：直鎖状）を環状で又は線状化して作製し、それらを細胞にトランスフェクション又はインジェクションすることが汎用されている。導入されたベクターDNAが哺乳動物由来の複製起点を含まない場合、ベクターは細胞に導入された後複製することができず、細胞の分裂に伴って失われていくため、導入遺伝子の発現は一過性となる。一方、複製起点を含む場合は細胞内で一時的に多コピー化するが、細胞分裂に伴う娘細胞への分配が均等になされないため、選択圧がない場合には次第に失われていく。

よってこの場合も発現は一過性となる。薬剤耐性遺伝子を同時に導入し、薬剤による選択圧をかけることによって導入遺伝子を構成的に発現する細胞株を選別することは可能だが、その場合、導入された遺伝子は宿主細胞の染色体に組み込まれる（インテグレーション）。この組み込みは、導入遺伝子及び宿主染色体の両方に影響を与える。宿主染色体にとっては、遺伝子が破壊される可能性がある（Pravtcheva ら, Genomics (USA), 第 30 巻, p. 529-544, 1995 年）。導入される遺伝子にとっては、コピー数が制御されない、不活性化される（Garrick ら, Nature Genet. (USA), 第 18 巻, p. 56-59, 1998 年）、組み込まれた宿主染色体上の制御配列の影響を受ける（Dobie ら, P. N. A. S. (USA), 第 93 巻, p. 6659-6664, 1996 年; Alami ら, Hum. Mol. Genet. (UK), 第 9 巻, p. 631-636, 2000 年）、などの問題点が残る。このため宿主染色体を破壊することなく、一定コピー数の遺伝子が導入可能な方法の開発が望まれる。このような問題点を解決するための一つの方法は、ヒトを含む動物細胞を宿主として自律複製／分配が可能な人工染色体を構築し、これをベクターとして動物細胞に遺伝子を導入することである。

15

#### (1) ヒト人工染色体 (HAC) の構築

従来、外来遺伝子を発現させるためのベクターを構築するという目標と、一方で細胞内での自律複製分配に必要な構造を特定するという生物学的側面から、動物細胞を宿主としたヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome; 以下、「HAC」ともいう) の構築が試みられてきた。HAC 構築のアプローチには (A) ボトムアップアプローチ、(B) 自然発生染色体断片の利用、及び (C) トップダウンアプローチ (天然の染色体をトリミング) の 3 種がある。

20

##### (A) ボトムアップアプローチ

大腸菌や酵母では自律複製／分配に必要な DNA 配列が特定されており、宿主細胞内で一定のコピー数が維持される人工染色体が構築されている (BAC ないし YAC)。同様の発想から、クローン化された配列既知の DNA 断片を動物細胞に導入してアセンブルするという、ボトムアップアプローチによる HAC 構築が試みられてきた。ヒト染色体セントロメアの構成要素であるアルフォイド配列

25

約 100 kb を含む YAC 由来の薬剤耐性遺伝子とヒトのテロメア配列を付加し、ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 に導入した例が報告されている (Ikenno ら, Nature Biotech. (USA), 第 16 巻, p. 431-439, 1998 年)。薬剤耐性細胞株では自律複製/分配が可能な人工染色体が構築されていたが、導入した DNA 配列そのものが細胞に保持されているのではなく増幅による再構成が生じており、細胞に保持される配列構造は明らかでない。

また HAC を構築することが目的であって、外来遺伝子の挿入を検討するには至っていない。

#### (B) 自然発生断片の利用

10 染色体はそれ自身が遺伝子の集合体であり、自律複製・分配に必要な要素を備えている。YAC など既存のクローニングベクターの容量を超える Mb 単位の巨大遺伝子を導入する目的で、一本の染色体又はその断片を遺伝子導入のツールとして利用することは、微小核細胞融合法により実現されている。マウス胚幹細胞に抗体遺伝子を含むヒト 14 番、2 番、22 番染色体断片を移入し、キメラ個体が作製できること、移入された抗体遺伝子が個体中で機能発現すること、ヒト染色体断片がキメラ個体で安定に保持されること、生殖系列を経て次世代伝達可能なことが示された (Tomizuka ら, Nature Genet. (USA), 第 16 巻, p. 133-143, 1997 年; Tomizuka ら, P. N. A. S. (USA), 第 97 巻, p. 722-727, 2000 年)。この例では、発現させたい遺伝子がのっている染色体そのものをベクターとして利用

15 することの有効性が示された。しかし目的とする遺伝子毎に染色体改変を行うことは現実的でない。染色体断片のベクターとしての利点を生かしなおかつその汎用性を高めるには、基本骨格となる染色体ベクターを用意し、これに目的とする遺伝子を簡便に挿入できることが望ましい。

このような目標のもと、染色体自然断片を利用して外来遺伝子を発現させる試みが報告されている。ヒト 1 番染色体由来の放射線染色体断片 (5.5 Mb) をベクターとし、IL-2 遺伝子 (cDNA) 又は CFTR 遺伝子 (ヒトゲノム DNA) の導入と機能発現が報告されている (Guiducci ら, Hum. Mol. Genet. (UK), 第 8 巻, p. 1417-1424, 1999 年; Auriche ら, EMBO Rep. (UK), 第 2 巻, p. 102-107,



2002 年参照。宿主はハムスター線維芽細胞（CHO）を用いている。この断片化されたミニ染色体への目的遺伝子の導入には、アルフォイドDNAを併用してヒト1番染色体セントロメア領域への挿入を期待しているが、詳細な挿入位置及びコピー数は特定されていない。IL-2依存性のマウスリンパ芽球細胞はIL-2ミニ染色体を保持するCHO細胞との細胞融合によりIL-2非依存的に増殖可能となり、機能相補が認められた。また、CFTRミニ染色体を保持するCHO細胞では、cAMP刺激による塩素イオン放出が認められ、CFTR阻害剤の添加によりその塩素イオン放出が抑制された。これらは染色体断片をベクターとして外来遺伝子を挿入・発現するための系を示したが、構造が明らかでなく、外来DNAの挿入が制御されていないという問題が残っている。

放射線雑種細胞由来の染色体断片（2～3 Mb）はハムスター細胞において安定に保持され、ヒト1番染色体セントロメアと長腕の一部及びSDHC（succinate dehydrogenase complex, subunit C）遺伝子を含む。SDHC領域での相同組換えによりG418耐性遺伝子が挿入された。マウス細胞（L及び3T3）を用いてX線細胞融合を行い、G418耐性雑種細胞を得た（Auら, Cytogenet. Cell Genet. (スイス), 第86巻, p. 194-203, 1999年）。このHACは、染色体自然断片を利用しているためその構造は明らかでない。外来遺伝子を部位特異的にHACに導入するために相同組換えを用いたが、導入効率が低く汎用性は低い。微小核細胞融合法は用いていないので、目的の染色体断片以外にも宿主染色体が共存する。染色体をベクターとして外来遺伝子を発現するという発想を提示するにすぎない。

また、染色体自然断片（環状）にloxPサイトをランダム挿入し、薬剤耐性遺伝子（hprt）の再構成を指標に外来遺伝子（ハイグロマイシン耐性遺伝子）を挿入した例が報告されている（Voetら, Genome Res. (USA), 第11巻, p. 124-136, 2001年）。この環状染色体はヒト20番染色体のセントロメアと1番染色体の一部（p22領域）を含むが、自然断片のため、配列は特定されていない。外来遺伝子をCre/loxPシステムによる部位特異的組換えにより導入しているが、染色体上へのloxP挿入はランダムであり、その構成は不明である。一方で微

小核融合によるマウス E S 細胞への移入、キメラ個体の作製、子孫伝達が示されている。染色体自然断片を利用した点、及び loxP サイトの挿入位置がランダムであるという点を除いて、人工染色体に目的遺伝子を挿入する手法は簡便ではあるが、患者（軽度の精神発達遅滞）由来の異常染色体を利用したことは安全性の点で問題が残り、実用的とはいえない。

### (C) トップダウンアプローチ

染色体自然断片を細胞に移入する場合、目的の遺伝子以外にも移入した染色体断片からその他多くの遺伝子が同時に発現することになる。マウス E S 細胞の実験では、ヒト染色体ごとに安定性が異なること、導入した染色体断片が大きいほどこれを保持する細胞のキメラ個体中での寄与率が下がることが知られている。余分な遺伝子の発現は染色体断片を保持する宿主細胞の増殖を妨げると推測される。そこで染色体改変によって余分な遺伝子を取り除くことで、移入染色体断片の保持率が上がると考えられる。

染色体の一部を削除する方法として、クローン化したテロメア配列を相同組換えにより導入し、染色体を短縮する技術（テロメアトランケーション）が報告されている（Itzhaki ら, Nature Genet. (USA), 第 2 巻, p. 283-287, 1992 年）。しかし多くの動物種の体細胞は相同組換えの頻度が極端に低いため、組換え体の取得には多大な労力を要する。これに対し高頻度に相同組換えを起こすニワトリ細胞株 DT40 を染色体改変の宿主として利用することで、効率的な染色体改変が可能になった（Kuroiwa ら, Nucleic Acids Res. (UK), 第 26 巻, p. 3447-8, 1998 年）。ヒト X 染色体を微小核細胞融合法によって DT40 細胞株に移入し、テロメアトランケーションを行った例が報告されている（Mills ら, Hum. Mol. Genet. (UK), 第 8 巻, p. 751-761, 1999 年）。短腕及び長腕の削除により 2.4 Mb の線状ミニ染色体が構築された。ミニ染色体はハムスター、ヒト細胞でも安定に保持されたが、コピー数の変化が見られた。HAC の安定性を確認しているにすぎず、これに外来の遺伝子を導入してベクターとして利用するには至っていない。

またハムスター細胞を宿主としてヒト Y 染色体をテロメアトランケーションに

より短縮し、宿主細胞中で安定に保持される約 4 Mb のミニ染色体を構築した例も報告されている (Heller ら, P. N. A. S. (USA), 第 93 巻, p. 7125-7130, 1996 年)。このミニ染色体を微小核細胞融合法によりマウス E S 細胞に移入したが、不安定であった。染色体再構成によってマウスセントロメア配列を取り込んだ派  
5 生ミニ染色体が E S 細胞中で安定性を獲得したため (Shen ら, Hum. Mol. Genet. (UK), 第 6 巻, p. 1375-1382, 1997 年)、キメラマウスを作製したところ、生殖系列伝達が確認された (Shen ら, Curr. Biol. (UK), 第 10 巻, p. 31-34, 2000 年)。キメラ染色体がマウス個体で保持されることは示されたが、その構造は染色体再構成のため不明であり、さらに外来遺伝子の導入及び発現については検討  
10 されていない。

## (2) HAC への外来遺伝子の挿入

上述したようなベクターとしての HAC 構築と並んで重要なことは、HAC に目的の遺伝子を導入する方法の確立である。しかし前述の如く現時点では HAC  
15 構築自体が途上の段階であり、外来遺伝子の導入については薬剤耐性遺伝子のランダム挿入が示されている程度で、詳細な検討はなされていないのが現状である。

ヒト抗体重鎖遺伝子を保持するマウスを作製する目的で単離されたヒト 14 番染色体由来の自然断片 SC20 は、マウスでの安定性と生殖系列伝達が確認されている。これに Cre/loxP システムを利用し、相互転座によって Mb 単位  
20 の染色体領域 (抗体軽鎖遺伝子を含むヒト 2 番及び 22 番染色体領域) をクローニングする方法 (染色体クローニング) が確立された (Kuroiwa ら, Nature Biotech. (USA), 第 18 巻, p. 1086-1090, 2000 年)。この場合も、不要な遺伝子を含まず構造が明らかな HAC 構築が目標だが、抗体遺伝子のように他のクローニングベクター (YAC など) の容量を超えた巨大遺伝子への適用で効果が発揮される。

25 いずれにしても、1) 構造が明らかであり、不要な遺伝子が除去されている、2) 培養細胞、個体で安定に維持される、3) 外来 DNA を簡便に導入可能、という条件を満たす HAC ベクター系は現在までに構築されていない。

### 発明の開示

本発明は、細胞中で安定に保持され、大きなサイズの外来遺伝子を簡便に挿入し、細胞に導入することができるヒト人工染色体ベクター及びその作製方法を提供することを目的とする。

- 5 本発明者は上記課題を解決するために、1) 動物細胞を宿主として、余分な遺伝子を含まず安定に保持される染色体ベクターを構築すること、2) 染色体ベクターにクローニングサイトを付与し、目的の遺伝子をクローニングサイトにカセット方式で挿入して発現させる系を構築することを課題として鋭意研究を行った。すなわち、ヒト21番染色体の長腕から既知の遺伝子を削除した改変染色体を得、
- 10 この改変染色体を保持するDT40雑種細胞の長期継代培養における安定性を確認した後、この改変染色体上の長腕近位にloxP配列とhCMVプロモーターを部位特異的に挿入し、Cre/loxPシステムによりGFP遺伝子を改変染色体に導入したところ、GFPの発現を確認することができた。その結果より、本発明者は、ヒト21番染色体断片に基づいて構築したHACベクターにより上
- 15 記課題を達成することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の概要は以下の通りである。

- 本発明は、その第1の態様において、長腕遠位及び／又は短腕遠位が削除されたヒト21番染色体断片又はヒト14番染色体断片を含むことを特徴とするヒト
- 20 人工染色体ベクターを提供する。

本発明の一実施形態において、前記ヒト21番染色体断片のサイズは、約2～16Mbであり、好ましくは約2～6Mbである。

- また本発明の一実施形態において、前記ヒト21番染色体の長腕遠位は、例えば21q11領域内で削除され、好ましくはAL163204において削除され
- 25 る。

さらに本発明の一実施形態において、前記ヒト21番染色体の短腕遠位は、例えば21p領域内で削除され、好ましくはAL163201において削除される。

本発明の別の実施形態において、前記ヒト14番染色体断片のサイズは、約20Mbであり、好ましくは約19Mb以下であり、さらに好ましくは18Mb以

下である。

また本発明の別の実施形態において、前記ヒト 1 4 番染色体の長腕遠位は、例えば 1 4 q 領域内において削除され、好ましくは A L 1 5 7 8 5 8 において削除され、さらに好ましくは A L 5 1 2 3 1 0 において削除される。

- 5      また、前記ヒト 1 4 番染色体の短腕遠位は、例えば 1 4 p 領域内において削除され、好ましくは 1 4 p 1 2 領域内において削除され、さらに好ましくは O R 4 H 1 2、O R 4 Q 4、R N R 2、O R 4 L 1、R N U 6 C、F D P S L 3、K 1 2 T、C 1 4 o r f 5 7、O R 6 S 1、M 1 9 5、O R 4 K 1 4、M G C 2 7 1 6 5、L C H、O R 1 0 G 3、O R 4 K 3、O R 4 E 2、H 1 R N A、A T P 5  
10    C 2、O R 1 1 H 6、及び O R 4 M 1 からなる群より選択されるいずれか 1 の位置において削除される。

- さらなる実施形態において、本発明に係るヒト人工染色体ベクターは、前記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位が挿入されている。好ましい実施形態においては、部位  
15    特異的組換え酵素の認識部位は、ヒト 2 1 番染色体の長腕近位の A L 1 6 3 2 0 3、又はヒト 1 4 番染色体の長腕近位の A L 1 5 7 8 5 8 より近位に、さらに好ましくは A L 5 1 2 3 1 0 における前記削除位置より近位に、又はヒト 1 4 番染色体の短腕近位の 1 4 p 1 2 領域内における前記削除位置より近位に挿入されている。また好ましい実施形態においては、部位特異的組換え酵素が C r e 酵素で  
20    あり、部位特異的組換え酵素の認識部位が L o x P 配列である。

本発明の別の実施形態においては、前記長腕遠位及び／又は短腕遠位の削除が人工テロメア配列との置換によるものである。

- また本発明は、その第 2 の態様において、以下のステップを含むヒト人工染色体  
25    ベクターの作製方法を提供する：

- (a) ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体を保持する細胞を得るステップ；
- (b) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；並びに

(c) 上記ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ。

本発明の一実施形態において、ステップ (a) においては、前記ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体を保持する細胞として相同組換え効率の高いものを用いる。好ましい実施形態においては、相同組換え効率の高い細胞はニワトリ DT 40 細胞由来のものである。

また本発明の一実施形態において、ステップ (b) においては、ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位の削除を人工テロメア配列との置換により行う。好ましい実施形態においては、ヒト 21 番染色体の長腕遠位を AL163204 において削除し、短腕遠位を AL163201 において削除する。また別の好ましい実施形態においては、ヒト 14 番染色体の長腕遠位を 14q 領域で削除し、短腕遠位を 14p12 領域内において削除する。またさらに好ましい実施形態においては、ヒト 14 番染色体の長腕遠位を AL157858、より好ましくは AL512310 において削除し、短腕遠位を OR4H12、OR4Q4、RNR2、OR4L1、RNU6C、FDPSL3、K12T、C14orf57、OR6S1、M195、OR4K14、MGC27165、LCH、OR10G3、OR4K3、OR4E2、H1RNA、ATP5C2、OR11H6、及び OR4M1 からなる群より選択されるいずれか 1 の位置において削除する。

さらに本発明の一実施形態において、ステップ (c) においては、部位特異的組換え酵素が Cre 酵素であり、部位特異的組換え酵素の認識部位が LoxP 配列である。

さらなる態様において、部位特異的組換え酵素の認識部位は、例えばヒト 21 番染色体の長腕近位の AL163203、ヒト 14 番染色体の AL157858 より近位に、さらに好ましくは AL512310 における前記削除位置より近位に、又はヒト 14 番染色体の短腕近位の 14p12 領域内における前記削除位置より近位に挿入することができる。

さらに本発明は、その第3の態様において、上記作製方法により得られる、ヒト人工染色体ベクターを提供する。

また第4の態様において、本発明は、上記ヒト人工染色体ベクターを保持する細胞を提供する。

5

本発明はさらに、その第5の態様において、上記作製方法において、以下のステップ(d)をさらに含むことを特徴とする、外来DNAを含むヒト人工染色体ベクターの作製方法を提供する：

(d) 部位特異的組換え酵素の存在下にてヒト21番染色体又はヒト14番染色体に外来DNAを挿入するステップ。

また第6の態様において、本発明は、上記作製方法により得られる、外来DNAを含むヒト人工染色体ベクターである。

さらに第7の態様において、本発明は、外来DNAを含むヒト人工染色体ベクターを保持する細胞を提供する。

15 本発明はさらに、その第8の態様において、上記外来DNAを含むヒト人工染色体ベクターを保持する細胞を含む医薬組成物を提供する。かかる場合、外来DNAは、エリスロポイエチン(EPO)、トロンボポイエチン(TPO)、血液凝固因子、フォンヴィルブランド因子(vWF)、ジストロフィン、ドーパミン合成酵素、インスリン、インスリン様増殖因子(IGF)、インスリン様増殖因子結合タンパク質(IGFBP)、抗体、テロメラゼ、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、免疫グロブリン、成長ホルモン、  
20 インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン4、インターロイキン5、インターロイキン6、インターロイキン7、インターロイキン8、インターロイキン9、インターロイキン10、インターロイキン11、インターロイキン12、インターロイキン15、CD40リガンド、インターフェロン、アデノシンデアミナーゼ、 $\alpha$ -1アンチトリプシン、オルニチントランスカルバミラーゼ、プリンヌクレオチドホスホリラーゼ、成長抑制因子(GIF)、腫瘍壊死因子(TNF)、白血病阻害因子(LIF)、オンコスタチンM、Flt3リガ  
25

ンド (F l t 3 L)、ストローマ由来因子 (S D F)、幹細胞増殖因子 (S C F)、  
繊維芽細胞増殖因子 (F G F)、上皮増殖因子 (E G F)、血管形成誘導因子 (V  
E G F)、アンジオポイエチン、神経成長因子 (N G F)、骨形成因子 (B M P)、  
アクチビン、トランスフォーミング増殖因子 (T G F)、ウイント (W n t)、  
5    などをコードする遺伝子とすることができる。

また本発明は、その第 9 の態様において、以下のステップを含む、外来 DNA  
を受容細胞に導入する方法を提供する：

- 10    (a) ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体を保持する供与細胞を得るステ  
ップ；
- (b) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕  
遠位を削除するステップ；
- (c) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕近位及び／又は短腕  
近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；
- 15    (d) 部位特異的組換え酵素の存在下にて上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4  
番染色体に外来 DNA を挿入するステップ；
- (e) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体を保持する供与細胞からミ  
クロセルを調製するステップ；
- (f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ；並びに
- 20    (g) 融合した受容細胞において外来 DNA の導入を確認するステップ。

本発明の一実施形態において、上記受容細胞は、動物細胞、好ましくは哺乳動  
物細胞である。また、上記受容細胞は、多分化能を有する細胞、例えば胚性幹細  
胞 (E S 細胞)、並びに間質系幹細胞及び組織幹／前駆細胞であってもよい。

25    さらに本発明は、その第 1 0 の態様において、以下のステップを含む、外来 D  
NA を発現する細胞の作製方法を提供する：

- (a) ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体を保持する供与細胞を得るステ  
ップ；



(b) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；

(c) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；

5 (d) 部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体に外来 DNA を挿入するステップ；

(e) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体を保持する供与細胞からマイクロセルを調製するステップ；

(f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ；並びに

10 (g) 融合した受容細胞において外来 DNA を発現する細胞を選択するステップ。

本発明の一実施形態において、上記受容細胞は、動物細胞、好ましくは哺乳動物細胞である。また、上記受容細胞は、多分化能を有する細胞、例えば胚性幹細胞（ES 細胞）、並びに間質系幹細胞及び組織幹／前駆細胞であってもよい。

15

またさらに本発明は、その第 1 1 の態様において、以下のステップを含む、タンパク質の製造方法を提供する：

(a) ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；

20 (b) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；

(c) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；

(d) 部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4  
25 番染色体にタンパク質をコードする外来 DNA を挿入するステップ；

(e) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体を保持する供与細胞からマイクロセルを調製するステップ；

(f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ；

(g) 融合した受容細胞を培地中で培養するステップ；並びに

(h) 得られる培養物から上記タンパク質を採取するステップ。

本発明の一実施形態において、上記タンパク質としては、例えば、エリスロポイエチン（EPO）、トロンボポイエチン（TPO）、血液凝固因子、第八因子、  
5 第九因子、フォンヴィルブランド因子（vWF）、ジストロフィン、ドーパミン合成酵素、インスリン、インスリン様増殖因子（IGF）、インスリン様増殖因子結合タンパク質（IGFBP）、抗体、テロメラゼ、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、免疫グロブリン、成長ホルモン、  
10 インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン4、インターロイキン5、インターロイキン6、インターロイキン7、インターロイキン8、インターロイキン9、インターロイキン10、インターロイキン11、インターロイキン12、インターロイキン15、CD40リガンド、インターフェロン、アデノシンデアミナーゼ、 $\alpha$ -1アンチトリプシン、オルニチントランスカルバミラーゼ、プリンヌクレオチドホスホリラーゼ、成長抑制因子（GIF）、腫瘍壊死  
15 因子（TNF）、白血病阻害因子（LIF）、オンコスタチンM、Flt3リガンド（Flt3L）、ストローマ由来因子（SDF）、幹細胞増殖因子（SCF）、繊維芽細胞増殖因子（FGF）、上皮増殖因子（EGF）、血管形成誘導因子（VEGF）、アンジオポイエチン、神経成長因子（NGF）、骨形成因子（BMP）、アクチビン、トランスフォーミング増殖因子（TGF）、ウイント（Wnt）、  
20 などが挙げられる。

本発明に関わる用語の定義は以下の通りである。

本明細書中、「ヒト人工染色体ベクター」又は「HACベクター」とは、ヒト染色体に基づいて作製された人工染色体を指す。

25 また本明細書中、「ヒト染色体」とは、ヒト細胞由来の天然のDNAとタンパク質との複合体を指す。正常なヒト染色体は23種（雄は24種）46本存在し、それぞれ約50～300Mbの長さのDNAを含むことが知られている。また「ヒト染色体断片」とは、独立染色体として安定に複製及び分配が可能な染色体の部

分断片を指し、断片の大きさは通常1 Mb以上だが、それ以下の場合もある。

本明細書中、染色体に関して「長腕」及び「短腕」とは、染色体上のセントロメア両側の腕（アーム）を指し、その長さに応じて長腕（q）及び短腕（p）と称される。またヒト染色体に関して「長腕遠位」及び「長腕近位」とは、長腕上のセントロメアから遠い位置（すなわちテロメア側）にある領域（遠位）及びセントロメアに近接する領域（近位）を意味する。具体的には、ヒト21番染色体の場合には長腕遠位はAL163204よりもテロメア側、長腕近位はAL163203よりもセントロメア側であり、またヒト14番染色体の場合には長腕遠位はAL132642よりもテロメア側、長腕近位はAL157858よりもセントロメア側である。さらに「短腕遠位」及び「短腕近位」とは、短腕上のセントロメアから遠い位置にある領域（遠位）及びセントロメアに近接する領域（近位）を意味する。具体的には、ヒト21番染色体の場合には短腕遠位及び短腕近位はAL163201において境界があり、またヒト14番染色体の場合にはリボソーマルRNA領域において境界がある。

15 本明細書中、「部位特異的組換え酵素」及び「部位特異的組換え酵素の認識部位」とは、ある酵素が特定の認識部位を認識して特異的にその認識部位でDNAの組換えを起こす現象に関して用いられる用語であり、それぞれその部位特異的に組換えを起こす酵素及び該酵素により認識される部位を指す。

20 本明細書中、「人工テロメア配列」とは、人工的に付加させたテロメア配列を指す。本発明においては例えばテロメアトランケーションによる人工テロメア配列の付加を行いうる。

25 本明細書中、「外来DNA」とは、対象とする細胞にとって外部から導入されるDNAを指し、物質生産及び機能改変又は機能分析などのために発現させることが望まれる遺伝子及びその他の機能配列（例えばプロモーター配列）などをコードするDNAを意味し、同種又は異種のいずれでもよい。

本明細書中、「供与細胞」及び「受容細胞」とは、ヒト人工染色体ベクターを移入又は導入する場合に、最初に該ベクターを保持する細胞（供与細胞）と、供与細胞から該ベクターが移入される細胞（受容細胞）を指す。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、ヒト 21 番染色体長腕遠位をテロメアトランケーションにより短縮削除する方法の概要を示す図である。

図 2 は、ピューロマイシン耐性 DT 40 株においてヒト 21 番染色体長腕遠位  
5 が削除されたことを示す PCR 解析の結果を示す図である。

図 3 は、ピューロマイシン耐性 DT 40 株において長腕遠位が削除されたこと、すなわち人工テロメア配列が部位特異的に導入されたことを示すサザンブロット解析の結果を示す写真である。

図 4 a 及び b は、ピューロマイシン耐性 DT 40 株において長腕遠位が削除さ  
10 れたことを示す FISH 解析の結果を示す写真である。図 4 a は DT 40 細胞に保持されているヒト 21 番染色体（矢印）を示し、図 4 b は長腕を削除したヒト 21 番染色体断片（矢印）を示す。

図 5 は、長腕遠位を削除したヒト 21 番染色体の長腕近位に loxP 配列を部位特異的に挿入する方法の概要を示す図である。

15 図 6 A 及び B は、ブラストサイジン耐性 DT 40 株において相同組換え体（ヒト 21 番染色体上に loxP 配列が部位特異的に導入された株）を選別するためのサザンブロット解析（A）及び PCR 解析（B）の結果を示す写真である。

図 7 a 及び b は、ブラストサイジン耐性 CHO-K1 株においてヒト 21 番染色体（断片）が保持されていることを示す FISH 解析の結果を示す写真である。

20 図 7 a はテロメアトランケーションを行う前の全長のヒト 21 番染色体を示し、図 7 b は長腕遠位を削除したヒト 21 番染色体断片を示す。

図 8 は、ヒト 21 番染色体長腕近位の loxP 配列に GFP コンストラクトを部位特異的に挿入する方法の概要を示す図である。

図 9 は、G 418 耐性 CHO-K1 株における GFP 発現の様子を示す蛍光顕  
25 微鏡写真である。

図 10 は、G 418 耐性 CHO-K1 株では、loxP 配列で部位特異的組換えが起きたことを示すサザンブロット解析の結果を示す写真である。

図 11 は、ヒト 21 番染色体短腕遠位をテロメアトランケーションにより短縮

削除する方法の概要を示す図である。

図12は、ハイグロマイシン耐性DT40株においてヒト21番染色体短腕遠位が削除されたことを示すPCR解析の結果を示す図である。

図13は、ハイグロマイシン耐性DT40株において短腕遠位が削除されたこと、すなわち人工テロメア配列が部位特異的に導入されたことを示すサザンブロット解析の結果を示す写真である。

図14は、ハイグロマイシン耐性DT40株において短腕遠位が削除されたこと、すなわち人工テロメア配列が部位特異的に導入されたことを示すPCR解析の結果を示す写真である。

10 図15a及びbは、ハイグロマイシン耐性DT40株において短腕遠位が削除されたことを示すFISH解析の結果を示す写真である。図15aはDT40細胞に保持されている長腕を削除したヒト21番染色体（矢印）を示し、図15bは長腕及び短腕を削除したヒト21番染色体断片（矢印）を示す。

図16は、KH21E細胞培養上清中に産生されたヒトEPOが組換え体ヒトEPOタンパク質（rhEPO）と同様の細胞増殖活性を保持する結果を示す図である。

図17は、ブラストサイジン耐性HT1080細胞株においてヒト21番染色体断片（矢印）が保持されていることを示すFISH解析の結果を示す写真である。

20 図18a及びbは、G418耐性HT1080株におけるGFP発現の様子を示す蛍光顕微鏡写真（図18a）及び位相差顕微鏡写真（図18b）である。

図19は、G418又はハイグロマイシン耐性E14株においてヒト21番染色体由来HACベクターが移入されたことを示すPCR解析の結果を示す図である。

25 図20a及びbは、薬剤耐性E14細胞株においてヒト21番染色体断片が保持されていることを示すFISH解析の結果を示す写真である。図20aは長腕遠位を削除した染色体断片（矢印）を示し、図20bはさらに短腕遠位を削除した染色体断片（矢印）を示す。

図 2 1 は、薬剤耐性 h i M S C 細胞株においてヒト 2 1 番染色体断片（矢印）が保持されていることを示す F I S H 解析の結果を示す写真である。

図 2 2 a 及び b は、H A C 移入 E S 細胞をインビトロで神経細胞に分化誘導した際に、G F P 発現の様子を示す蛍光顕微鏡写真（図 2 2 a）及び抗  $\beta$  チューブリン抗体で染色した蛍光顕微鏡写真（図 2 2 b）である。

#### 発明の実施をするための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2002年10月4日に出願された日本国特許出願第2002-292853号の優先権を主張するものであり、上記特許出願の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

本発明は、ヒト人工染色体ベクター（以下、「本H A C ベクター」ともいう）に関するものであり、該H A C ベクターは、ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体に基づいて作製され、長腕遠位及び／又は短腕遠位が削除されたヒト 2 1 番染色体断片又はヒト 1 4 番染色体を含むことを特徴とするものである。

ヒト 2 1 番染色体は、セントロメア領域を除く長腕全体及び短腕の一部について塩基配列が公共のデータベース上に公開されている（例えば、<http://hgp.gsc.riken.go.jp/chr21/index.html> (Riken Genomic Sciences Center, Human Genome Research Group) を参照されたい）。このような配列情報を利用することで、後述する人工テロメア配列や  $10 \times P$  配列などを相同組換えによって部位特異的に挿入することが可能となる。また、長腕遠位の削除によって約 4.8 Mb の 2 1 番染色体が  $1/3$  の約 1.6 Mb となり、また長腕遠位及び短腕遠位の削除によって最終的には約 2 Mb の、既知遺伝子を含まないH A C ベクターが構築できる。

以前にマウス E S 細胞へヒト 2 1 番染色体を移入し、キメラマウスを作製した実験では、移入した染色体の部分断片が次世代に伝達した。宿主細胞の機能を阻害する遺伝子を含んだ移入染色体領域が排除された結果、安定化したと考えられている (Kazuki ら, J. Hum. Genet., 46:600, 2001)。一方ヒト Y 染色体の場合、

マウス E S 細胞中では不安定であったが、セントロメアの構成要素であるアルフォイド DNA をマウス染色体から取り込むことによって安定化が起きたと報告されている (Shen ら, Hum. Mol. Genet., 6:1375, 1997)。これらのことから、雑種細胞中でのヒト染色体の安定性は染色体毎に異なり、安定性にはセントロメアが関与すると考えられる。先の実験でヒト 21 番染色体のセントロメア (大きさは約 2 Mb と考えられている: Triowell ら, Hum. Mol. Genet., 2:1639-1649, 1993; Wang ら, Genome Res. 9: 1059-1073, 1999) はマウス細胞/個体中でも機能することが示されているので、セントロメア領域を含むヒト 21 番染色体断片に基づいて作製した本 HAC ベクターは、雑種細胞中で安定に保持されることが期待できる。

また同様に、ヒト 14 番染色体の配列情報に関しても一部について塩基配列が公共のデータベース上に公開されている。さらにヒト 14 番染色体由来の自然断片 (SC20; Tomizuka ら, P. N. A. S., 97: 722-727, 2000 年) に加工を加えた HAC ベクターにおいてもヒト 21 番染色体の場合と同様の縮小化が可能であるとされる。SC20 は、ヒト 14 番染色体の長腕遠位及び長腕近位の多くの部分を欠失していることが報告されている (Tomizuka ら, P. N. A. S., 97: 722-727, 2000 年; Kuroiwa ら, Nature Biotech. (USA), 第 18 巻, p. 1086-1090, 2000 年)。具体的には、SC20 は、ヒト 14 番染色体長腕のテロメア配列から AL137229 (GenBank 登録番号) を含む領域、及びこれよりさらにセントロメア側の AL121612 (GenBank 登録番号) から AL157858 (GenBank 登録番号) のテロメア側から 24-26 kb までを含む領域を保持している。また、AL137229 (GenBank 登録番号) と AL121612 (GenBank 登録番号) 間の領域、及び AL157858 (GenBank 登録番号) のテロメア側 24-26 kb からセントロメア間の領域を欠失している。一方、ヒト 14 番染色体の短腕領域は保持されている。この SC20 はヒト細胞を含む細胞株やマウス個体において安定に維持され (Shinohara ら, Chromosome Res., 8:713-725, 2000)、SC20 のリボソーマル RNA 領域 (ヒト 14 番染色体短腕部に位置する) に loxP 部位を挿入した改変 SC20 にお

いてもその安定性は保たれていた (Kuroiwa ら, Nature Biotech. (USA), 第 18 巻, p. 1086-1090, 2000 年)。さらに、それ自身は不安定なヒト 22 番染色体断片由来の約 10 Mb の染色体領域を、その改変 SC20 の loxP 部位に転座させた HAC もまた、マウス ES 細胞やマウス個体で安定であった。SC20 の問題点は、14 番染色体 14q32 領域の遺伝子を複数含んでいることであるが、本明細書に記載された方法で SC20 を縮小化することにより、様々な細胞種で安定に維持され、かつ余分な遺伝子を含まない HAC ベクターを得ることができる。

以下に、本 HAC ベクターの作製、ベクターへの外来 DNA の挿入、及び本 HAC ベクターの用途について記載する。

#### 1. ヒト人工染色体 (HAC) ベクターの作製

本 HAC ベクターは、上述したようにヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体に基づいて作製する。本 HAC ベクターの作製には、以下の (a) ~ (c) のステップが含まれる：

(a) ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体を保持する細胞を得るステップ；

(b) 上記ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；並びに

(c) 上記ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ。

ここで、上記ステップ (b) と (c) の順序は特に限定されない。

#### ステップ (a) : ヒト染色体を保持する細胞の作製

本 HAC ベクターの作製においては、ヒト染色体 (例えばヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体) を保持する細胞を用意する。そのような細胞としては、ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体のみを保持し、かつその後の操作のために相同組換え率の高いものが好ましい。従って本発明においてはまずこれらの条件を満たすような細胞を作製する。



ヒト染色体を保持する細胞は、例えば、ヒト単一染色体を保持する公知のマウスA9雑種細胞ライブラリーからヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持するクローンを選択し、その染色体を相同組換え率の高い細胞に移入することにより作製することができる。マウスA9雑種細胞ライブラリーは、薬剤耐性遺伝子で標識されたヒト単一染色体を保持するものであり、例えば、WO 00/10383号、Tanabe, H.ら (Chromosome Res., 8: 319-334, 2000) などに記載されている。またヒト21番染色体及びヒト14番染色体を保持するマウスA9雑種細胞は、Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) にそれぞれ登録番号JCRB2221 (細胞名A9 (Hygro21)) 及びJCRB2214 (細胞名A9 (Hygro14)) として登録されており、その詳細な情報・培養法なども入手可能である。

上述のようにして入手したマウスA9雑種細胞に保持されるヒト染色体を、相同組換え率の高い細胞に移入する。ここで「相同組換え率の高い細胞」とは、その細胞において相同組換え操作を行った際に、相同組換えの頻度が高い細胞を指し、そのような細胞としては、例えば、ニワトリDT40細胞 (Diekenら, Nature Genetics, 12:174-182, 1996)、マウスES細胞 (相沢慎一, バイオマニュアルシリーズ8, ジーンターゲティング, 羊土社, 1995)、などが挙げられる。特に、操作の簡便性などの点から、本発明においてはニワトリDT40細胞を利用することが好ましい。

20

染色体の移入は、当技術分野で公知の染色体移入法に従って行うことができる。例えば、所望の染色体を1本だけ導入する手法として、Koiら (Koiら, Jpn. J. Cancer Res., 80: 413-418, 1973) に記載されているミクロセル法が挙げられる。この手法は、ある種の細胞において紡錘体形成を阻害する薬剤により誘導されるミクロセルを分離し、これを受容細胞と融合することにより、少数の染色体を導入するというものである。このミクロセル法を利用してヒト染色体を移入する具体的な操作手順に関しては、例えばWO 97/07671号及びWO 00/10383号を参照されたい。以上のようにしてヒト21番染色体又はヒト14番染

色体を保持する細胞を作製することができる。

あるいは、本発明においては、全長のヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体ではなく、天然に部分断片化した染色体、例えばヒト 14 番染色体の部分断片（SC20）を保持する細胞を使用することも可能である。SC20 染色体断片を保持するニワトリ DT-40 細胞（SC20）は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に 2001 年 5 月 9 日付けで国際寄託され、受託番号 FERM BP-7583 が与えられている。

10       ステップ（b）：ヒト染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位の削除

HAC ベクターの作製においては、ヒト染色体を保持する細胞において、当該染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除する。染色体の削除は、当技術分野で公知の方法により行うことができ、例えば WO 00/10383 号に記載されている人工テロメア配列との置換（テロメアトランケーション）により行うことが好ましい。長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するための具体的な手順は、例えば、ヒト染色体を保持する細胞において、人工テロメア配列を保持するターゲティングベクターを構築し、相同組換えにより染色体上の所望の位置に人工テロメア配列の挿入されたクローンを取得した後、テロメア・トランケーションによる欠失変異体を得るというものである（Itzhaki ら、Nature Genet., 2:283-287, 1992；及び Brown ら、P. N. A. S., 93:7125, 1996 を参照されたい）。ここで染色体の所望の位置とは、削除対象の長腕遠位又は短腕遠位の切断位置であり、この位置に人工テロメア配列が相同組換えにより置換・挿入されて、長腕遠位又は短腕遠位が削除される（テロメアトランケーション）。所望の位置は、ターゲティングベクターを構築する際に標的配列の設計により適宜設定することができ、例えば長腕遠位を削除する場合には、ヒト 21 番染色体上の 21q11 領域内、好ましくは AL163204（GenBank 登録番号）の塩基配列に基づいて標的配列を設計し、その標的配列よりもテロメア側においてテロメアトランケーションが起こるようにすることによって、標的配列を設定した領域において長腕遠

位が切断、削除される（例えば、黒岩ら、Nucleic Acid Research, 26:3447, 1998）。また例えば短腕遠位を削除する場合には、ヒト21番染色体上の21P領域内、好ましくはAL163201（GenBank登録番号）の塩基配列に基づいて標的配列を設計することができる。標的配列の設計は、上述した領域に限定されず、所望のHACベクターを作製するように当業者であれば適宜設計することが可能である。

また例えばヒト14番染色体の長腕配列をSC20よりもさらにセントロメア側に削除する場合、AL157858領域の塩基配列に基づいて標的配列を設計し、その標的配列よりもテロメア側においてテロメアトランケーションが起こるようにすることによって、標的配列を設定した領域において長腕遠位を切断、削除することができる。また例えば短腕遠位を削除する場合には、ヒト14番染色体上の14p領域内、好ましくは14p12領域内、さらに好ましくはOR4H12、OR4Q4、RNR2、OR4L1、RNU6C、FDPSL3、K12T、C14orf57、OR6S1、M195、OR4K14、MGC27165、LCH、OR10G3、OR4K3、OR4E2、H1RNA、ATP5C2、OR11H6、又はOR4M1（米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) のオンラインゲノムデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?ORG=hum&CHR=14&BEG=0.00&ENI>)）の塩基配列に基づいて標的配列を設計することができる。標的配列の設計は、上述した領域に限定されず、所望のHACベクターを作製するように当業者であれば適宜設計することが可能である。

また例えばインタクトなヒト14番染色体の長腕配列を削除する場合には、14q領域内、好ましくはAL512310（GenBank登録番号）の塩基配列に基づいて標的配列を設計し、その標的配列よりもテロメア側においてテロメアトランケーションが起こるようにすることによって、標的配列を設定した領域において長腕遠位を切断、削除することができる。また例えば短腕遠位を削除する場合には、ヒト14番染色体上の例えば14p領域内、好ましくは14p12領域内、さらに好ましくはOR4H12、OR4Q4、RNR2、OR4L1、

- RNU6C、FDPSL3、K12T、C14orf57、OR6S1、M195、OR4K14、MGC27165、LCH、OR10G3、OR4K3、OR4E2、H1RNA、ATP5C2、OR11H6、又はOR4M1（米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) のオンラインゲノムデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?ORG=hum&CHR=14&BEG=0.00&ENI>)）の塩基配列に基づいて標的配列を設計することができる。標的配列の設計は、上述した領域に限定されず、所望のHACベクターを作製するように当業者であれば適宜設計することが可能である。
- 5
- 10 上述のようにして、長腕遠位及び／又は短腕遠位が削除されたヒト染色体断片を形成させ、それを保持する細胞が得られる。このような染色体のサイズの縮小化により、細胞における安定性を達成することができる。また、本HACベクターを保持する細胞、及び後述する本HACベクターが導入される細胞の機能・増殖などに悪影響を与えないように、悪影響を及ぼすと推定される染色体領域を除去することができる。
- 15

#### ステップ（c）：部位特異的組換え酵素の認識部位の挿入

- 本HACベクターの作製においては、ヒト21番染色体又はヒト14番染色体に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入する。このステップ（c）は、上記ス
- 20 テップ（b）の前又は後のいずれで行ってもよく、これらの順番は特に限定されない。すなわち、ヒト21番染色体又はヒト14番染色体において、長腕遠位及び／又は長腕遠位を削除した後で部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入してもよいし、あるいは部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入した後で長腕遠位及び／又は長腕遠位を削除してもよい。
- 25 当技術分野においては、ある酵素が特定の認識部位を認識して特異的にその認識部位でDNAの組換えを起こす現象が知られており、本発明においてはそのような酵素及び認識部位の系を利用する。例えば、そのような系としては、Cre／loxPシステムが知られている（例えば、Sauer, B. ら, P. N. A. S., 85:5166

-5170, 1988 を参照されたい)。C r e はバクテリオファージ P 1 由来の 3 8 K D のタンパク質であり、リコンビナーゼの I n t (インテグラーゼ) ファミリーに属するものである。この酵素は、約 3 4 b p の認識部位 l o x P 配列を認識して、この部位で特異的に D N A の組換えを起こす。またこの l o x P 配列の方向性によって、2 つの l o x P 配列間の D N A の欠失又は転座が生じることが知られている。またその他の、特異的な配列を認識して組換え反応を起こす系としては、出芽酵母由来のレコンビナーゼ F L P (Broach ら, Cell, 21:501-508, 1980)、ファージ p h i C 3 1 由来のインテグラーゼ (Thorpe ら, P. N. A. S., 95:5505-5510, 1998) などがあり、哺乳動物細胞でもこれらの酵素による D N A 組換え反応が起きることが報告されている (Koch ら, Gene, 249:135-144, 2000 ; Thyagarajan ら, Mol. Cell. Biol., 21:3926-3934, 2000)。

ヒト染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に、上記部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するには、公知の遺伝子組換え手法、例えば相同組換え法を利用することができる。部位特異的組換え酵素の認識部位の挿入位置は、当業者であれば、必須ではない遺伝子の位置などを考慮して適宜設定することができる。例えば、ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕近位又は短腕近位の任意の位置に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入する。かかる挿入位置としては、例えば、ヒト 2 1 番染色体については長腕近位の A L 1 6 3 2 0 3 などが挙げられ、またヒト 1 4 番染色体については長腕近位の A L 1 5 7 8 5 8 (G e n B a n k 登録番号) より近位、さらに好ましくは長腕近位の A L 5 1 2 3 1 0 (G e n B a n k 登録番号) における前記削除位置より近位、又はヒト 1 4 番染色体の短腕近位の 1 4 p 1 2 領域内における前記削除位置より近位などが挙げられる。

その後、後述する外来 D N A の導入手法に従ってリポーター遺伝子を導入し、その発現を確認することによって、ヒト染色体上に挿入した認識部位の位置の適否を確認することができる。

上記例示した認識部位のうち 1 種類を 1 つ又は複数挿入してもよいし、あるいは、異なる系の認識部位を複数挿入してもよい。後述するように、本 H A C ベクターは、部位特異的組換え酵素の認識部位を有するため、外来 D N A を部位特異

的に導入することが可能であり、さらに、認識部位の設定により外来DNAの導入位置を決定できるため、外来DNAの導入位置が一定となり位置効果 (position effect) をうけることもない。また外来DNAの導入操作も簡便となる。さらに異なる系の認識部位を複数挿入することによって、複数の外来DNAを逐次挿入することもできる。

上述のようにしてヒト染色体を改変して作製した本HACベクターには、部位特異的組換え酵素の認識部位の他、プロモーター、薬剤耐性遺伝子などのベクター構築において一般的に挿入される配列又はエレメントが挿入されていてもよい。そのような配列又はエレメントは、上述したように相同組換え法を利用して本HACベクターの所望の位置に挿入することができる。

さらに本発明者は、上述のように作製した本HACベクター（ヒト21番染色体又はヒト14番染色体）を保持する細胞を、選択薬剤を含まない培地で長期にわたり継代培養し、経時的にHACベクターの保持率をFISH法により検定したところ、本HACベクターは宿主細胞（例えばDT40細胞及びCHO細胞）において安定に保持されることを確認することができた。

## 2. HACベクターへの外来DNAの導入（ステップ（d））

上記HACベクターの作製において、部位特異的組換え酵素の存在下にて外来DNAを挿入するステップ（d）を行うことにより、本HACベクターに外来DNAを導入することができる。このステップ（d）は、上述したステップ（c）の後に行うものであるが、ステップ（b）との順序は特に限定されず、ステップ（b）の前又は後に行うことができる。従って、ステップ（b）～（d）の順序は明細書に記載する順序に限定されないことに留意されたい。

外来DNAとは、対象とする細胞にとって外部から導入されるDNAを指し、遺伝子及びその他の機能配列などをコードするDNAである。本発明において導入対象となる外来DNAとしては、物質生産及び機能改変又は機能分析などのために発現させることが望まれる遺伝子及びその他の機能配列などをコードするDNAであれば特に限定されない。その他の機能配列とは、遺伝子が発現するため

に機能する配列を指し、例えば、プロモーター、エンハンサー、シグナル配列などが挙げられる。

外来DNAの導入は、上記挿入されている部位特異的組換え酵素の系を利用し  
て行う。例えば、Cre酵素の認識部位であるloxP配列と外来DNAを保持  
5 するターゲティングベクターを構築する。続いて本HACベクター（ヒト21番  
染色体又はヒト14番染色体）を保持する細胞において、Cre酵素を細胞内で  
発現させることにより、loxP配列と人工テロメア配列に挟まれた領域と、上  
記ターゲティングベクターとの部位特異的組換えにより、外来DNAを本HAC  
ベクター上に挿入させることができる（黒岩ら, Nature Biotech., 18:1086, 2000）。

10 本HACベクターには、部位特異的組換え酵素の認識部位（loxP配列）を  
保持する環状DNAが挿入できる。このため大腸菌を宿主としたプラスミド、B  
AC、PACや、酵母を宿主とした環状YACなど既存のベクターによりクロー  
ン化されたDNAを挿入することができる。またヒト染色体に基づいて作製され  
ていることから、本HACベクターに導入可能な外来DNAのサイズの上限は1  
15 00 kbオーダーまで拡張され、従来発現実験に用いられてきたプラスミドベク  
ターに組み込まれたcDNAだけではなく、遺伝子の発現制御領域を含むゲノム  
DNAも導入可能である。

例えば、本HACベクターに外来DNAを挿入して構築された、外来DNAを  
含むHACベクターは、その挿入によって安定構造が変化する可能性、さらに外  
20 来DNAを含むHACベクター全体の大きさが不利に大きくなる可能性も考えら  
れるので、導入（挿入）する外来DNAの大きさは、通常約10 Mb～約1 kb、  
好ましくは約3 Mb～約2 kb、さらに好ましくは約1 Mb～約3 kbとする。

従来のcDNA強制発現ベクターを用いた遺伝子導入法では、過剰発現による  
細胞毒性や増殖抑制などの副作用が生じ、導入遺伝子を恒常的に発現する細胞株  
25 が得られない例が多い。この問題点を克服し、生理的な発現パターンを保ちなが  
らなおかつ発現を人工的に制御するには、テトラサイクリンなどを利用した遺伝  
子発現誘導系の適用が望ましい。導入可能なインサートサイズが大きく、一定の  
コピー数が安定に保持されるという本HACベクターの特徴はこのように目的に  
適っている。

組織特異的／生理的な遺伝子発現は、遺伝子をコードするゲノム領域からの転写、転写産物の編集、核外への輸送、翻訳の各段階で制御を受ける。一つの遺伝子に対して複数のプロモーターがあつて転写開始点が異なったり、スプライシングにバリエーションが生じることで、組織特異的なアイソフォームが発現することが知られている。クローン化 cDNA は一つの遺伝子に由来する複数の転写産物バリエーションの 1 つにすぎない。生理的な遺伝子発現を再現するためには、ゲノム DNA として制御配列を含んだ遺伝子領域を導入することが望ましい。本 HAC ベクターの利用はこのような目的に適うものである。

ヒト 21 番染色体断片を保持するマウス ES 細胞からキメラ個体を作製したところ、次世代伝達が確認されたことから、ヒト 21 番染色体のセントロメアはマウス細胞及び個体中で複製分配保持されと考えられる (Kazuki ら, J. Hum. Genet., 46:600, 2001)。そのため、本 HAC ベクターもまたマウス個体中で安定に保持される可能性が高い。

ヒトゲノムプロジェクトでは、ゲノム DNA は BAC クローンとして単離され、塩基配列が決定された。このため公開されているデータベース (GenBank など) では、塩基配列は BAC 単位でも登録されている。遺伝子機能解析の 1 手段としてトランスジェニックマウスの作製がある。本 HAC ベクターをプラットフォームとして BAC を挿入することで、位置効果を受けることなく常に同一条件下で遺伝子の発現を解析することが可能になる。多くの BAC ベクターは loxP 配列を保持しているため、本 HAC ベクターへの挿入をネガティブ選別する系を用いれば、塩基配列既知の BAC を本 HAC ベクターにカセット形式で簡便に挿入できると考えられる。

上述した以外にも、本 HAC ベクターへの外来 DNA の導入手法及び導入の利点があり、以下にそのいくつかを例示する。

#### (1) 相互転座による染色体部分断片の導入

Cre 酵素による loxP 配列間の部位特異的組換えは、線状染色体と環状インサート (外来 DNA) の場合は挿入反応が起こるが、線状染色体同士では相互



転座の反応が起きる。これを利用すれば環状インサートにクローニングできない Mb 単位以上の染色体断片を本 HAC ベクターに導入することができる (Kuroiwa ら, Gene Ther. 9:708, 2002)。

## 5 (2) 挿入体選別法

本明細書の実施例に記載する方法においては、本 HAC ベクターへの外来 DNA の挿入は、薬剤耐性遺伝子の再構成を指標としたポジティブ選別を利用している (組換え体のポジティブ選別に関しては、WO 00/10383 号を参照されたい)。これに代わって、チミジンキナーゼ/ガンシクロビル系などのネガティブ選別により、インサート挿入体 (外来 DNA が挿入されたもの) を得ることも可能である。この場合、挿入する環状 DNA には loxP 配列のみが含まれていればよい。ゲノムプロジェクトで用いられた BAC ライブラリーは loxP 配列を含んでいるので、このようなネガティブ選別の系が確立できれば配列既知のゲノムクローンを本 HAC ベクターに容易に挿入することが可能になる。

15

## (3) 複数インサートの挿入

本発明において好ましく用いられる loxP 配列は P1 フェージに由来する野生型の配列であり、Cre 酵素による HAC ベクター上の loxP 配列への環状インサートの挿入反応は可逆的である。本明細書に記載する実施例においては、Cre 酵素を一過性に発現させ、薬剤耐性の獲得を指標に部位特異的な組換え体を選別することにより構成的な挿入体を得られた。一度環状インサートが挿入されると、HAC ベクター上に 2 つの loxP 配列が残る。このため再度 Cre 酵素を発現させると逆反応 (環状インサートの切り出し) が起きる可能性もあり、二次的にインサートを挿入するなどのさらなる HAC ベクターの改変は困難となる。一方、塩基置換を行った変異 loxP 配列の組み合わせによっては、反応方向及び反応の特異性を限定できるとの報告がある (Hoess ら, Nucleic Acids Res., 14:1986; Araki ら, Nucleic Acids Res., 25:868, 1997; Lee ら, Gene, 216:55, 1998)。このような変異 loxP 配列を用いることで、上述した逆反応を起こさ

25

ず、複数の環状インサートを逐次挿入する系も構築可能である。

#### (4) コピー数依存的発現制御

5  $\alpha$  グロビン遺伝子トランスジェニックマウスを用いて宿主染色体上にランダムに挿入された遺伝子のコピー数とmRNA発現量の関係を解析した報告 (Sharpe  
ら、Proc Natl Acad Sci USA, 90:11262, 1993) では、発現量と導入遺伝子コピー数  
との間に相関は認められない。これは、トランスジェニック動物系統により導入  
10 遺伝子の発現量が大きく異なり、また導入した遺伝子のコピー数に比例しない発  
現が起こるポジション効果と呼ばれる現象によるものであると考えられ、トラン  
スジェニック動物における遺伝子導入においては頻繁に起こる現象である。また、  
導入遺伝子のポジション効果を排除して比較するため外来DNAの挿入位置を予  
め宿主染色体上に導入した  $loxP$  サイトに確定し  $Cre-loxP$  組換え反応  
によりプラスミドベクターから目的のDNAユニットを導入するトランスジェニ  
ックマウスの報告 (Garrick ら、Nature Genet., 18:56, 1998) があるが、ここ  
15 でもコピー数依存的発現制御は実現されていない。

一方、チロシナーゼゲノム領域を導入したYACを用いて作製したトランスジ  
ェニックマウスにおいて、導入したゲノム領域のコピー数依存的なチロシナーゼ  
発現が認められたが (Schedl ら、Nature, 362:258-261, 1993)、生理的発現制  
御領域を含むゲノムを用いる点でポジション効果の影響を受けないと考えられ、  
20 本発明のような生理的制御領域を含まない人工的な遺伝子発現ユニットのみを多  
コピー化して発現させるものではない。また、各種のエピソームベクターは、宿  
主染色体と独立に存在し外来DNA挿入位置も決まっているが、細胞内でのベク  
ター自身のコピー数を厳密に制御するには至っていない (Morlino ら、ppl Environ  
Microbiol., 65:4808-4013, 1999 ; Cooper ら、Proc Natl Acad Sci USA.,  
25 94:6450-6455, 1997)。

本発明においては、実施例9に示すとおり、目的遺伝子 (EPOを使用) の発  
現ユニットを多コピー連結して並列配置し、HACベクター上の決まった位置 ( $loxP$   
サイト) に導入することにより、宿主染色体に変異を与えることなくコピ

一數依存的発現制御を行なうことができる。

従って、本発明の方法により、外来DNAとして多コピーの目的遺伝子を所望の細胞に導入し、該細胞において該目的遺伝子をコピー数依存的に発現させることが可能であると共に、該細胞を用いて作出したトランスジェニック動物においては、ポジション効果を受けることなく従来困難であったコピー数依存的な目的遺伝子の発現を達成することが可能となる。

### 3. HACベクターの細胞への移入

本HACベクター又は外来DNAを含む本HACベクターを保持する細胞から、  
10 それらのベクターをその他の細胞へ移入することができる。移入先となる細胞は、特に限定されるものではないが、動物細胞（哺乳動物細胞）などが挙げられる。本発明においては、無傷の状態でヒト染色体を移入可能であることが知られているチャイニーズハムスター卵巢（CHO）細胞を用いることが好ましい（WO 00/10383号参照）。CHO細胞は、効率良くマイクロセルを形成することが知られており（例えば、Koiら、SCIENCE 260:361, 1993）、これにより本HACベクターをCHO細胞からさらに別の細胞（CHO細胞以外の細胞）へ移入することも可能である。また、本発明においては、本HACベクターを多分化能を有する細胞に移入することも可能である。「多分化能を有する細胞」とは、所定の操作により、特定の細胞又は組織に分化可能な細胞を意味する。例えば、宿主胚  
20 への注入又は集合胚形成などの操作を行うことによって、キメラ動物の2種類以上の細胞又は組織に分化可能な細胞、具体的には、胚性幹細胞（ES細胞）、胚性生殖細胞（EG細胞）、胚性腫瘍細胞（EC細胞）などが含まれる。また、例えば、増殖因子（例：トランスフォーミング増殖因子；TGF）などを添加した誘導培地における培養により、骨細胞、軟骨細胞又は脂肪細胞に分化可能な細胞、  
25 具体的には、体性幹細胞（例：間葉系間細胞）などが含まれる。

本明細書中で使用される「胚性幹細胞」とは、ES細胞とも称され、未分化性（全能性）を維持したまま増殖可能なことを特徴とする初期胚由来の培養細胞を意味する。すなわち胚性幹細胞は、動物の初期胚中の胚盤胞の内部に存在する未

分化幹細胞である内部細胞塊の細胞を培養し、未分化状態を保ったままで増殖し続けるように樹立された細胞株である。また「胚性生殖細胞」とは、EG細胞とも称され、上記胚性幹細胞とほぼ同等の能力を有することを特徴とする始原生殖細胞由来の培養細胞を意味する。胚性生殖細胞は、受精後数日～数週間、例えば

5 マウスの場合には約 8.5 日経過した胚から得た始原生殖細胞を培養し、未分化状態を保ったままで増殖し続けるように樹立された細胞株である。

また、ヒトを対象とした遺伝子細胞治療や組織再生治療において材料となる細胞は、ガン化などを避けるための安全性の観点から、不死化細胞ではなく正常細胞を用いることが望ましいとされている。不死化細胞やガン化細胞への染色体移入例は、ヒト及びその他の動物で数多くあるが、正常体細胞への染色体移入例は、ウシにおいて胎仔正常繊維芽細胞への移入(Kuroiwa ら、Nature Biotech., 20:889, 2002) が報告されているものの、ヒトにおいては少なくとも検索キー；c h r o m o s o m e , t r a n s f e r , h u m a n , n o r m a l , p r i m a r y

10 o r s o m a t i c , c e l l , で米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) のオンライン文献データベース P u b M e d (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>) をサーチする限りにおいて該当するものは見当たらない。これらのことから、ヒト正常体細胞への染色体移入が困難であるという認識が一般的であった。

20 本発明においては、実施例 13 及び 14 に示すとおり、ヒト 14 番染色体由来断片又はヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターのヒト正常繊維芽細胞への移入が可能であることが初めて示された。また、本発明の方法により、繊維芽細胞以外のヒト正常体細胞へのヒト 14 番染色体由来断片又はヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターの移入が可能である。さらに、本発明の方法に従って作製されたヒト

25 染色体由来 HAC ベクターであれば、ヒト 14 番染色体又はヒト 21 番染色体に制限されることなく、ヒト正常体細胞に移入することが可能である。

HAC ベクターの細胞への移入は、マイクロセル法を利用して行うことができる。

ミクロセル法は、上記「1. ヒト人工染色体（HAC）ベクターの作製」の項に記載のように行うことができる。

また、本HACベクターの細胞への移入について、最初に用意したヒト染色体を保持する細胞から、ヒト染色体への改変を行うステップの前、ステップの間、  
5 又はステップの後のいずれの段階においてもヒト染色体（HACベクター）を他の細胞へ移入することが可能である。

#### 4. HACベクターの用途

本発明の目的は、ベクターという基本ツールとその利用技術の提供であり、学  
10 術研究から産業に至る非常に幅広い領域に波及効果をもたらすことが期待される。  
①宿主染色体に挿入されず独立して維持される（宿主遺伝子の変異やがん化の懸念がない）、②一定のコピー数で長期間安定に保持される（過剰発現、発現消失の懸念がない）、③導入可能なDNAの長さの制限がない（正常な発現制御を保證するDNAエレメントを含む遺伝子や複数遺伝子を同時に導入可能である）、  
15 という本HACベクターの特徴は、従来のベクターで不可能であった多くのことを可能にすると想像される。本HACベクターの用途としては、限定するものではないが主要なものを挙げると、①動物培養細胞における遺伝子機能解析用ベクター、②ヒト疾患遺伝子治療用ベクター、③ヒト臓器幹細胞、胚幹細胞（ES細胞）への遺伝子導入用ベクター、④遺伝子導入動物作製用ベクター（例：ヒト疾患モデル動物作製、KO動物と組み合わせた特定遺伝子のヒト化）、などが考え  
20 られる。以下に、本HACベクターの用途の一例として、（1）外来DNAの受容細胞への導入、（2）外来DNAを発現する細胞の作製、（3）タンパク質の製造、（4）遺伝子機能解析用ベクター、（5）幹細胞への遺伝子導入用ベクター、（6）培養フィーダー作製用ベクター、及び（7）ヒト疾患治療用ベクター  
25 を説明する。

##### （1）外来DNAの受容細胞への導入

本HACベクターは、細胞中で外来DNAを挿入したり、外来DNAが挿入さ

れたHACベクターを他の細胞に移入したりできるため、外来DNAを所望の受容細胞に導入することができる。外来DNAの受容細胞への導入には、例えば以下のステップが含まれる：

- 5      (a) ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；
- (b) 上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；
- (c) 上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；
- 10     (d) 部位特異的組換え酵素の存在下にて上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体に外来DNAを挿入するステップ；
- (e) 上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞からミクロセルを調製するステップ；
- (f) 上記ミクロセルと受容細胞とを融合するステップ；並びに
- 15     (g) 融合した受容細胞において外来DNAの導入を確認するステップ。

ステップ(a)～(d)は、上述したように行うことができ、ステップを行う順序はこれに限定されない。

- ステップ(e)及び(f)においては、ヒト染色体を保持する供与細胞から、
- 20     ミクロセル法を利用して受容細胞に当該染色体断片を移入する。移入対象となるヒト染色体は、ステップ(b)～(d)における染色体の改変前、改変ステップの途中、又は改変後のものとすることができる。従って、例えばステップ(d)においてヒト染色体に外来DNAを挿入する前に、ヒト染色体を保持する供与細胞から、ミクロセル法を利用して受容細胞に当該染色体を移入してもよい。その
  - 25     後、ステップ(d)の外来DNAの挿入操作を受容細胞において行って、外来DNAが挿入されたヒト染色体を受容細胞に保持させることもできる。これらのステップは他の順序で行うこともでき、ステップ(d)～(f)の順序は、上記順序に限定されない。

ミクロセル法は、上記「1. ヒト人工染色体（HAC）ベクターの作製」の項に記載のように行うことができる。ここで用いる受容細胞は、特に限定されるものではないが、動物細胞、特に哺乳動物細胞（例えばマウス細胞、ヒト細胞など）が好ましい。また、上述したような多分化能を有する細胞、例えば胚性幹細胞（ES細胞）、並びに間質系幹細胞及び組織幹／前駆細胞などを受容細胞として用いることも可能である。

続いて、ステップ（g）においては、受容細胞に外来DNAが導入（移入）されているか否かを確認する。この確認は、当技術分野で公知の手法により行うことができ、例えば、外来DNAの制限酵素部位に対応するプローブを用いたサザンブロット解析などにより、外来DNAの導入を確認することができる。

本HACベクターを用いることにより、大きなサイズの外来DNAを細胞に導入し、安定に保持させることが可能となる。

## （2）外来DNAを発現する細胞の作製

本HACベクターは、上述したように、細胞中で外来DNAを挿入したり、外来DNAが挿入されたHACベクターを他の細胞に移入したりできるため、外来DNAを発現する細胞を作製することもできる。外来DNAを発現する細胞の作製には、例えば以下のステップが含まれる：

（a）ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；

（b）上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；

（c）上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；

（d）部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体に外来DNAを挿入するステップ；

（e）上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞からミクロセルを調製するステップ；

(f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ；並びに  
(g) 融合した受容細胞において外来DNAを発現する細胞を選択するステップ。

5      ステップ(a)～(f)は、上述したように行うことができ、ステップを行う順序はこれに限定されない。

ステップ(g)においては、受容細胞において外来DNAの発現を確認し、外来DNAを発現する細胞を選択する。外来DNAの発現の確認は、当技術分野で公知の手法により行うことができ、例えば、外来DNAに対応するプローブを用いたノーザン・ブロット法などが挙げられる。

10

本HACベクターを用いることにより、大きなサイズの外来DNAを発現する細胞を作製することが可能となる。

### (3) タンパク質の製造

15      本HACベクターを利用することにより、上述したように、外来DNAを細胞に導入することや、外来DNAを発現する細胞を作製することができるため、当該外来DNAによりコードされるタンパク質を製造することができる。タンパク質の製造には、例えば以下のステップが含まれる：

20      (a) ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；

(b) 上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；

(c) 上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；

25      (d) 部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体にタンパク質をコードする外来DNAを挿入するステップ；

(e) 上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞からマイクロセルを調製するステップ；



- (f) 上記マイクロセルと受容細胞とを融合するステップ；
- (g) 融合した受容細胞を培地中で培養するステップ；並びに
- (h) 得られる培養物から上記タンパク質を採取するステップ。

5      ステップ（a）～（f）は、上述したように行うことができ、ステップを行う順序はこれに限定されない。

ステップ（g）では、ステップ（f）で融合した受容細胞を培地中で培養する。受容細胞を培養するための培地は、炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、上記受容細胞の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地  
10      のいずれを用いてもよく、当業者であれば適切な培地を選択し、また必要により適宜修正を加えて培地を調製することができる。また、振盪培養又は通気攪拌培養等の好氣的条件、温度、pH、培養期間なども適宜設定する。

培養後、ステップ（h）に記載するように、得られる培養物からタンパク質を採取する。「培養物」とは、培養上清のほか、培養細胞又は細胞の破砕物のいずれをも意味するものである。培養終了後、該培養物よりタンパク質を採取するには、通常のタンパク質精製手段等を用いて得ることが出来る。例えば、細胞内に生産された場合は、常法により細胞を超音波破壊処理、磨砕処理、加圧破砕等によりタンパク質を抽出する。必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を添加する。また、  
15      培養上清に生産された場合は、培養液そのものを用いることが出来る。そして、  
20      この溶液を濾過、遠心分離等を行い固形部分を除去し、必要によりプロトタミン処理等により核酸を除去する。

次いで、これに硫酸、アルコール、アセトン等を添加して分画し、沈殿物を採取し、粗タンパク質溶液を得る。該タンパク質溶液を各種クロマトグラフィー、電気泳動等にかけて精製酵素標品を得る。例えば、セファデックス、ウルトロゲル若しくはバイオゲル等を用いるゲル濾過、イオン交換体クロマトグラフィー、  
25      ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法、アフィニティクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を用いる分画法を適宜選択し、又はこれらを組合せることにより、精製された目的のタンパク質を得ることが出来る。しかし、上

記培養法、精製法は一例であって、これに限定されるものではない。

本発明において、製造対象となるタンパク質は、製造が望まれるタンパク質であれば特に限定されるものではないが、一例としては、エリスロポイエチン（EPO）、トロンボポイエチン（TPO）、血液凝固因子、フォンヴィルブランド因子（vWF）、ジストロフィン、ドーパミン合成酵素、インスリン、インスリン様増殖因子（IGF）、インスリン様増殖因子結合タンパク質（IGFBP）、抗体、テロメラゼ、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、免疫グロブリン、成長ホルモン、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン4、インターロイキン5、インターロイキン6、インターロイキン7、インターロイキン8、インターロイキン9、インターロイキン10、インターロイキン11、インターロイキン12、インターロイキン15、CD40リガンド、インターフェロン、アデノシンデアミナーゼ、 $\alpha$ -1アンチトリプシン、オルニチントランスカルバミラーゼ、プリンヌクレオチドホスホリラーゼ、成長抑制因子（GIF）、腫瘍壊死因子（TNF）、白血病阻害因子（LIF）、オンコスタチンM、Flt3リガンド（Flt3L）、ストローマ由来因子（SDF）、幹細胞増殖因子（SCF）、繊維芽細胞増殖因子（FGF）、上皮増殖因子（EGF）、血管形成誘導因子（VEGF）、アンジオポイエチン、神経成長因子（NGF）、骨形成因子（BMP）、アクチビン、トランスフォーミング増殖因子（TGF）、ウイント（Wnt）などが挙げられる。このような製造対象のタンパク質をコードする遺伝子（すなわち外来DNA）は、例えば公の遺伝子データベースなどを利用してその配列情報を入手することができる。

#### （４）遺伝子機能解析用ベクター

本HACベクターに挿入した外来DNAは、細胞中でコピー数依存的かつ安定的に発現されるため、本HACベクターは、遺伝子機能を解析するために利用することができる。

標的遺伝子をコードする塩基配列の一部に相補的な配列からなる二本鎖RNA（double-stranded RNA；dsRNA）を発現させることにより標的遺伝子の発現

を抑制する手法、RNA干渉が知られている（例えば、短鎖干渉RNA（siRNA）に関しては、Elbashir ら、Nature, 411:494, 2001 ; McCaffrey ら、Nature, 418:38, 2002 を参照。また、Shinagawa, T. ら、Genes & Development, 17:1340-1345, 2003 も参照）。dsRNAをコードするDNAを遺伝子発現誘導系とともにHACベクター上に導入することにより、標的遺伝子のコンディショナルな機能抑制が可能である。また、遺伝子発現誘導系に替えてゲノム領域を利用することで組織特異的／生理的な部位での機能抑制が可能である。

また、目的分子による作用効果を解析しようとする場合に、その目的分子の用量依存性を指標として解析する手法がある。この手法において、本発明に従って目的分子をコードする遺伝子の発現ユニットのコピー数を変えてHACベクター上へ導入し、細胞等（組織、個体も含む）に移入することにより、該細胞等におけるコピー数依存的発現制御に基づいて用量依存性解析を行なうことが可能である。また、遺伝子発現制御のために発現誘導系やゲノム領域を利用することでコンディショナル又は組織特異的／生理的な機能解析が可能である。

#### （５）幹細胞への遺伝子導入用ベクター

本発明の方法により作製したHACベクターは、実施例20及び21に示したように胚性幹（ES）細胞又は間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cell; MSC）への遺伝子導入用ベクターとして利用することができる。そして上記HACベクターはES細胞又はMSCにおいて長期間安定に存在できる。

実施例20及び21に示したように、本発明の方法により作製したHACベクターを保持するMSCから分化誘導した組織細胞においてはHACベクターが安定に保持される。また、ヒト21番染色体断片を保持するマウスES細胞からキメラ個体を作製すると、該染色体断片が次世代伝達すること及び組織中のES細胞から分化した細胞においてヒト21番染色体断片が保持されていることが確認されたことから（Kazuki ら、J. Hum. Genet., 46:600, 2000）、本発明の方法により作製したHACベクター移入ES細胞から分化誘導した組織細胞においてもHACベクターが安定に保持されることが考えられる。

また近年、様々な組織の幹細胞及び骨髄由来の多能性細胞が同定されている(横田ら、実験医学(増刊)、19巻15号、2001年、羊土社、岡野ら、実験医学(増刊)、21巻8号、2003年、羊土社、Liら、Nature Med., online:31 August 2003, doi:10.1038/nm925)。本発明の方法により作製したHACベクターは、組織幹/前駆細胞、例えば骨髄、血液、神経、筋肉、肝臓、脾臓、皮膚、内耳などに由来する多能性幹/前駆細胞、への遺伝子導入用ベクターとして利用可能である。

さらに、ES細胞、MSC、及び組織幹/前駆細胞のヒト臨床応用を考える場合、治療処置に必要な量の細胞を増幅し、所望の分化状態で提供することが求められる。従来では、多分化能を保持したまま幹細胞だけを大量に増幅することは容易ではなく、課題の一つとなっている(日野ら、実験医学、19巻15号増刊:10、2001、羊土社)。例えば、造血幹細胞や神経幹細胞を生体組織から採取し培養すると、幹細胞だけでなく幹細胞から分化した前駆細胞や成熟細胞も同時に増幅されるため、臨床用途には好ましくない(岡野 榮之、実験医学、19巻15号増刊:80-90、2001、羊土社)。

本発明においては、多分化能保持に関わる因子、例えばマウスES細胞では、活性化型Stat3, Oct-3/4, Nanogなどの転写因子(Niwaら、Genes Dev., 12:2048, 1998;Matsudaら、EMBO J., 18:4261, 1999;Niwaら、Nature Genet., 24:373, 2000;Mitsuiら、Cell, 113:631, 2003;Chambersら、Cell, 113:643, 2003)をコードするDNAを導入したHACベクターを作製し幹細胞へ移入することにより、宿主染色体を変異させることなく多分化能を保持しかつ簡便に幹細胞を増幅させるために利用することが可能である。

また、幹細胞の分化制御においては、関与する分子の発現量のコントロールが重要な要素になっている。例えば、マウスES細胞における上記Oct-3/4による分化制御においてその発現量が生理的発現レベルを100%とした場合は未分化状態を維持するが、50%以下の場合は栄養外胚葉に分化し、また150%以上では原始内胚葉に分化する(Niwaら、Nature Genet., 24:373, 2000)。このような発現レベルの変化により分化を制御する場合には、本発明の方法により

作製したHACベクターに遺伝子発現ON/OFF誘導系（例えばテトラサイクリンによる発現誘導系）を導入することにより、厳密な発現量のコントロールが可能となる。

- 5 また、本発明の方法により作製したHACベクターに遺伝子発現ON/OFF誘導系（例えばテトラサイクリンによる発現誘導系）と分化誘導因子とを組み合わせ、多分化能保持状態と分化誘導状態を切替えることが可能である。

- 10 幹細胞による組織再生を行う場合、移植細胞又はドナー由来の再生組織は、長期間（望ましくは生涯）にわたりレシピエント個体の一部となり機能する。それ故にガン化などの生理的制御の逸脱をドナー細胞に誘発する原因（例えば遺伝子変異）を与える操作は極力避けることが望ましい。本HACベクターは、宿主染色体と独立に存在できることから、遺伝子導入を宿主染色体に変異を与えずに行なうことができる。また実施例13、14、18及び19に示すとおり、ヒト細胞中
- 15 胞中で安定に存在できることから、長期間にわたり安定に目的分子を発現することができる。

- 本発明の方法に従って、分化させた組織で生理的に発現する遺伝子のゲノム領域又は組織特異的発現制御領域を含むゲノム配列下に目的の遺伝子を融合したDNAを導入したHACベクターを作製し、上記HACベクターを移入した幹細胞
- 20 を用いることにより、再生した組織において生理的／組織特異的に目的分子を発現することが可能である。

- また、本発明の方法により作製したHACベクターを保持する幹細胞を分化誘導した後、導入遺伝子の発現が必要なければHACベクターは不用となる場合がある。分化誘導後にHACベクター脱落クローンを、方法を特に限定するものではないが例えば選択培養における薬剤耐性を指標にして選別することにより、不用となったHACベクターを排除することが可能である。
- 25

#### （6）培養支持フィーダー細胞作製用ベクター

細胞培養法の一つとして、培養器底面に付着性細胞を敷き詰めた培養支持フィーダー細胞上に目的の細胞を播種し共培養する方法が知られている（日本生化学会編、新生化学実験講座14発生分化老化、1992年、東京化学同人）。例えば造血前駆細胞を増殖させる場合には、SCF、Flt3L、TPO、IL-6、  
5 sIL-6Rなどの必要な因子をそれぞれ例えば組換え体タンパク質として準備し、培養液に添加して培養する（Uedaら、J Clin Invest., 105:1013-1021, 2000）。従来法により培養添加物の遺伝子を培養支持フィーダー細胞へ導入することが可能であるが、宿主染色体へのランダム挿入による変異・ポジション効果、発現不活化、多コピー発現ユニット並列による下流遺伝子発現の減弱などにより、  
10 の因子について望みの発現量を制御して供給することは困難と考えられる。本発明の方法によりこれらの必要因子をコードするDNA全て（又は一部）を導入したHACベクターを作製し、培養支持フィーダー細胞へ移入することにより、組換え体タンパク質などを後から加えることなく単なる共培養だけで簡便に必要な因子を全て補給することが可能である。また、遺伝子発現誘導系を利用すること  
15 でこれら因子のコンディショナルな発現制御が可能である。

#### （7）ヒト疾患治療用ベクター

ヒト疾患治療用のベクターは、ウイルス性及び非ウイルス性ベクターが従来から各種研究されているが、免疫反応の惹起、導入DNAサイズの限界、宿主染色体挿入変異、低導入効率・低発現効率、発現量制御が困難（金田 安史、臨床免疫、39巻：551-558、2003年、科学評論社、小澤 敬也編、遺伝子治療、1997年、羊土社）など、様々な課題が指摘されている。いずれのベクターにも共通する課題として、「望ましい発現量を、望ましいタイミングで制御する」ことが求められている。

25 HACベクターを用いた遺伝子細胞治療の戦略として、①1次的に欠損している酵素やタンパク質の補充、②2次的に減少している代謝産物を補充する対症療法、③細胞に新機能を付加し、細胞の生存を高める方法（例えば改変細胞を用いる組織再生において、HACベクターはゲノムを導入することにより生理的／組

織特異的遺伝子発現制御を行なうことが可能である。またこれにより過剰発現又は発現不足による機能障害などの副作用を回避することができる。）、④Gain of functionの形で進行する変性疾患の障害をくいとめる方法（例えばパーキンソン病におけるGDNF補充治療）などが挙げられる。

- 5 すなわち、本HACベクターは、ヒト疾患治療用ベクターとして使用することが可能であり、治療用の外来DNAを導入したHACベクターを細胞へ移入後、その細胞を患者に投与するための医薬組成物として調製することが可能である。また、かかるヒト疾患治療用ベクターは、疾患の治療のみならず、疾患の予防にも使用することが可能である。
- 10 適用範囲を特に限定するものではないが、以下にヒト疾患治療用ベクターとしての適用例を示す。

#### （A）テロメラーゼの利用

- 15 遺伝子細胞治療や組織再生治療において材料となる細胞は、その安全性観点から不死化細胞ではなく正常細胞を用いることが望ましい。しかし正常体細胞は、一定回数分裂すると増殖・分裂が止まりやがて死滅する、すなわち老化することが知られている（井出 利憲、実験医学、16巻18号増刊：18—24、1998、羊土社）。治療効果を長期間持続させるために、治療用細胞は一定期間、望ましくは罹患者の生涯を通して維持されることが必須である。染色体末端に存在する繰返し配列テロメアの修復酵素であるテロメラーゼは、正常細胞内で過剰
- 20 発現させることにより細胞老化時に認められるテロメア短縮を抑制し、細胞の寿命を延長できることが知られている（Bodnarら、Science, 279: 349—352, 1998）。またテロメラーゼは、細胞内で過剰発現させても不死化又はガン化を導くものではないことが示されている（真貝 洋一、実験医学、16巻18号増刊：25—30、1998、羊土社、Jiangら、Nature Gent., 21:111-114, 1999）。それゆえ、本発明の方法によりヒトテロメラーゼ（hTERT）をコードする遺伝子をHACベクター上に導入し標的となる細胞へ移入することにより、HAC移入細胞の寿命を延長し、不死化又はガン化させることな
- 25

く治療効果を長期間持続させることが可能である。また、遺伝子発現制御を発現誘導系やゲノム領域を利用することにより、コンディショナル又は組織特異的／生理的なテロメラーゼ発現が可能である。

## 5 (B) 自己抗体生成の抑制

- 組換え体タンパク質製剤を開発する場合、投与時の自己抗体（活性中和抗体）の生成が障害となっている（Liら、Blood, 98:3241-3248, 2001）。患者への投与方法を特に限定するものではないが、本発明の方法により作製した目的タンパク質をコードするゲノムを導入したHACベクターを、
- 10 ヒト細胞、例えば産生組織の正常ヒト細胞へ移入後、これを患者へ移植する。該患者においてHACベクターから目的タンパク質を生理的／組織特異的に発現・供給することにより、患者における自己抗体生成の抑制が可能である。

## (C) 免疫遺伝子細胞療法における遺伝子導入用ベクター

- 15 再発白血病に対する治療法として、移植片対白血病反応により移植リンパ球が腫瘍特異的細胞傷害性T細胞として白血病細胞を攻撃することを応用したドナーリンパ球輸注療法（Kolbら、Blood, 76:2462, 1990）が知られている。上記療法の副作用として、移植細胞がレシピエント組織を攻撃し障害を与える移植片対宿主病が知られているが、これに対するひとつの対処法として、ドナーリンパ球へのレトロウイルスによる薬剤誘導性の自殺遺伝子導入及び薬剤投与によるドナー
- 20 リンパ球の除去が行われている（小野寺ら、ゲノム医学, 3巻:45, 2003, メディカルレビュー社）。上記方法の場合、ドナーリンパ球の染色体に変異を与える危険性が残る。

- 本発明の方法により作製したHACベクターは、宿主染色体に変異を与えない
- 25 免疫遺伝子細胞療法における遺伝子導入用ベクターとして利用することが可能である。また、抗腫瘍活性促進を目的とした治療、例えばリンパ腫におけるCD40リガンドによる免疫活性化療法（加藤ら、ゲノム医学, 3巻:53, 2003, メディカルレビュー社）など、における遺伝子導入用ベクターとしても利用する



ことが可能である。

(D) モノクロナール完全ヒト抗体補充

近年ヒト抗体産生マウスを利用した、完全ヒトモノクロナール抗体医薬品の創  
5 製が試みられている（石田ら、Bioベンチャー、2巻：44、2002、羊土  
社、Moriら、Cell Death and Differentiation, in press, 2003, Proceedings of  
American Association for Cancer Reserach, Volume 44, 2nd Edition, July 2003,  
p1285, #6422）。しかし、これを慢性疾患へ適用する場合には、定期的なTPO  
10 投与のため病院への通院が必要となり患者のQOLの障害となることが予測され  
る。また、組換え体タンパク質製剤の製造には多大なコストがかかり、その結果  
として高額な医療費負担が生じることも課題の一つとなっている。

本発明の方法により作製したHACベクター上に、目的の抗体を産生するハイ  
ブリドーマから単離した目的抗体をコードするゲノム領域を導入し、例えば患者  
造血幹細胞やB細胞へ上記HACベクターを移入後、患者へ再移植することによ  
15 り、完全ヒト抗体を生理的発現制御により補充・供給することが可能である。ま  
た上記により定期的な通院治療回数を減らし患者のQOLを向上させることが可  
能である。

(E) 単一遺伝性疾患における欠損補充

20 (E-1) 血友病

血友病Aは、血液凝固第8因子の変異、血友病Bは血液凝固第9因子の変異が  
原因となって起こる、伴性劣性遺伝性出血疾患である。治療法として第8又は第  
9因子濃縮製剤投与による補充療法が有効であるが、出血後投与では重篤な合症  
が生じること、濃縮製剤への病原体混入の可能性、反復投与による自己抗体（活  
25 性中和抗体）の発生、常時出血への対処準備による患者QOLの低下、高額な医  
療費など課題は多く、遺伝子治療法による解決が期待されている。従来ベクター  
による臨床遺伝子治療研究が行われているが、十分な発現を長期間持続できず有  
意な治療効果を得るに至っていない。また、レトロウイルス及びアデノ随伴ウイ

ルス（AAV）ベクターを直接投与する臨床研究において被験者の精液中にベクター遺伝子が検出され生殖細胞への遺伝子導入の危険性が指摘されている（望月ら、ゲノム医学，3巻：25，2003，メディカルレビュー社）。第8因子をコードする遺伝子は、全長ゲノムで約1.5Mb、cDNAで約7kbにわたる。

- 5 非ウイルスベクターやアデノウイルスベクターでは、全長cDNAの導入は可能であるが発現量の低下が、またAAVベクターでは、導入DNAサイズが約4.9kb以下に限られるため全長遺伝子を導入できないことが課題となっている。

本発明の方法により血液凝固第8因子又は第9因子をコードするDNAを導入したHACベクターを作製することが可能である。そして、患者への投与方法を  
10 特に限定するものではないが、上記HACベクターを、例えばヒト細胞へ移入後、罹患者への移植により補充することが可能である。また、患者への投与方法を特に限定するものではないが、上記血液凝固第8因子又は第9因子のゲノム領域を導入したHACベクターを、例えばヒト細胞へ移入後、該細胞の罹患者への移植により、生理的組織特異的発現により該因子を補充することが可能である。

15

#### （E-2）X-SCID（X連鎖重症複合免疫不全症）

- 重症複合免疫不全症（SCID）は、液性及び細胞性免疫が先天的に障害される疾患である。SCIDの約半数がX連鎖のX-SCIDであり、その原因はインターロイキン2ファミリーの受容体が共有する共通 $\gamma$ 鎖の変異であることが知られている。治療法として、造血幹細胞移植が行われているが、液性免疫の回復  
20 は不十分で免疫グロブリンの定期的投与が必要となる。そこで造血幹細胞へ共通 $\gamma$ 鎖を導入し移植する遺伝子細胞治療法による解決が期待されている。1999年からレトロウイルスにより共通 $\gamma$ 鎖を導入した造血幹細胞移植の臨床研究が行われていたが、近年フランスにおいて移植細胞の白血病化が複数例報告された  
25 （Hacein-Bey-Abina ら、N Engl J Med., 348:255, 2003; Marshall ら、Science, 299:320, 2003）。何れのケースも遺伝子導入細胞染色体中の原ガン遺伝子の一つであるLMO2遺伝子領域にベクター配列挿入変異が認められ、LMO2活性化と腫瘍化との関連が疑われている（久米ら、ゲノム医学，3巻：9，2003，

メデイカルレビュー社)。

本発明の方法により共通 $\gamma$ 鎖をコードするDNAを導入したHACベクターを作製することが可能である。そして上記HACベクターを遺伝子導入用ベクターに用いることにより宿主染色体へのベクター配列挿入変異の危険を回避することが可能である。また、患者への投与方法を特に限定するものではないが、上記HACベクターを、ヒト細胞（例えばヒト骨髄由来正常造血幹細胞）へ移入し、罹患患者へ移植することにより、生理的組織特異的発現による共通 $\gamma$ 鎖の欠損機能相補を行うことが可能である。

10 (E-3) デイシェンヌ型筋ジストロフィー ; DMD

デイシェンヌ型筋ジストロフィーは、ジストロフィン遺伝子の変異によるジストロフィンの機能欠損が原因である、X連鎖劣性単一遺伝子性疾患の一つである (Hoffman ら、Cell, 51:919, 1987)。DMDの治療は、ジストロフィンが細胞骨格タンパク質であるため直接投与による補充は不可能であり、遺伝子治療が期待されている。

ジストロフィン遺伝子は、全長ゲノムで約2.3Mb、cDNAで14kbにわたる。非ウイルスベクターやアデノウイルスベクターでは、全長cDNAの導入は可能であるが発現量の低下が課題となっている (Liu ら、Mol. Ther., 4:45, 2001; DelloRusso ら、Proc Natl Acad Sci USA, 97:12979, 2002)。またAAVベクターでは、導入DNAサイズが約4.9kb以下に限られるため全長遺伝子を導入できず、また骨格筋への遺伝子導入実験において免疫反応が引き起こされ導入遺伝子産物の発現低下が認められた (Yuasa ら、Gene Therapy, 9:1576, 2002)、などの課題が存在する。

遍在的な発現を誘導するCMVプロモーター制御下にジストロフィンミニ遺伝子を導入したAAVベクターによる骨格筋への遺伝子導入実験においては、免疫反応が引き起こされ導入遺伝子産物の発現低下が認められたが、プロモーターとして骨格筋特異的なMCKプロモーターを使用することにより上記免疫応答が改善された (Yuasa ら、Gene Ther., 9:1576, 2002)。このことから、ジストロフ

インの発現には生理的組織特異的発現が必要であることが示唆される。

本発明の方法によりジストロフィンをコードするゲノム領域を導入したHACベクターを作製することが可能である。そして、患者への投与方法を特に限定するものではないが、上記HACベクターを、ヒト細胞（特に限定するものではないが例えば自家ヒト正常筋芽細胞）へ移入し、罹患者へ移植することにより、生理的組織特異的発現によるジストロフィン補充を行うことが可能である。

(E-4) 適用対象疾患を特に限定するものではないが、例えば以下に示す単一性遺伝子疾患； $\alpha$ -1アンチトリプシン欠損症、嚢胞性繊維症（CFTR）、慢性肉芽腫症、家族性高コレステロール症、ファンコーニ貧血、ゴーシェ病、ハンター症候群、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、プリンヌクレオチドホスホリラーゼ欠損症、ADA-SCID、白血球接着欠損症、Canavan病、脳梁萎縮、ファブリー病、筋萎縮性側索硬化症などにおいて、本発明の方法により原因遺伝子を導入したHACベクターを作製し、患者への投与方法を特に限定するものではないが、例えばヒト細胞へ移入して患者へ移植するなどによって、欠損分子の補充・相補を行うことが可能である。なお、疾患原因遺伝子情報については、米国National Center for Biotechnology Information (NCBI)のオンライン文献データベースPubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>) 又は OMIM<sup>TM</sup>- Online Mendelian Inheritance in Man<sup>TM</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>) を参照されたい。

#### (F) その他疾患

(F-1) トロンボポイエチン (Thrombopoietin; TPO) は、血小板産生制御及び造血幹／前駆細胞の増殖を担う因子であり、例えば再生不良性貧血などの血液疾患、化学療法後の造血回復などへの適用が期待されている。しかし、TPO組換え体タンパク質投与時の活性中和抗体生成が医薬品開発の障害となっている (Lira, Blood, 98:3241-3248, 2001)。従って、T

P Oを慢性疾患へ適用する場合には、定期的なT P O投与のため病院への通院が必要となり患者のQ O Lの障害となることが予測される。また、組換え体タンパク質製剤の製造には多大なコストがかかり、その結果として高額な医療費負担が生じることも課題の一つとなっている。

- 5      本発明の方法によりT P Oゲノムを導入したH A Cベクターを作製し、患者への投与方法を特に限定するものではないが、ヒト細胞、例えば産生組織の細胞、へ移入し、生理的／組織特異的にT P Oを発現・供給することにより、自己抗体生成を抑制することが可能である。また上記により定期的な通院治療回数を減らし、患者のQ O Lを向上させることが可能である。

10

- (F - 2) エリスロポイエチン (Erythropoietin ; E P O) は、赤血球増殖因子であり、例えば糖尿病や腎疾患における腎性貧血などの治療薬として市販されている。慢性疾患（例えば糖尿病による腎性貧血など）では定期的なE P O投与のため病院への通院が必要であり患者のQ O Lの障害となっている。また、組換え体タンパク質製剤の製造には多大なコストがかかり、その結果として高額な医療費負担が生じることも課題の一つとなっている。本発明の実施例1 4に示したように、E P O c D N A導入したH A Cベクターをヒト正常繊維芽細胞へ移入し患者へ移植することにより、該患者においてE P Oを発現・供給することが可能である。また、本発明の方法により、E P Oゲノム領域を導入したH A Cベクターを作製し、患者への投与方法を特に限定するものではないが、ヒト細胞、例えば産生組織の細胞、へ移入し、生理的／組織特異的にE P Oを発現・供給することが可能である。また上記により定期的な通院治療回数を減らし、患者のQ O Lを向上させることが可能である。
- 15
- 20

25      (F - 3) パーキンソン病

パーキンソン病は、中脳黒質緻密部ドーパミン合成細胞の進行性の変性脱落により運動機能が障害される神経疾患である。治療法の一つとして、欠損したドーパミン補充を目的としたL - D O P A投与方法があるが、中等以上の症状では薬効

が減弱することや副作用による患者のQOL制限・投与量減少などの課題が存在する。これら課題は、ドーパミン濃度が線状体内で一定しないこと及び投与したL-DOPAが線状体以外で作用することに起因するため、線状体での一定したドーパミンの生理的発現が求められる（武田ら、メデイカルサイエンスダイジェスト、29巻：20、2003年、ニュー・サイエンス社）。現在、ドーパミン合成に関わる酵素3種類を各々導入したAAVベクターによる遺伝子治療研究がなされているが、いずれも生理的発現制御を行うまでには至っていない。また、ドーパミン合成細胞の変性脱落抑制を目的とした治療法にGDNF（Glia-derived Neuronal Factor）投与があるが、被殻下にカテーテル留置による持続投与で効果が認められた（Gillら、Nature Med., 9:589, 2003）一方で感染の危険性や患者のQOL制限などが課題となっている。AAVベクターによる遺伝子治療研究により動物モデルで効果が示された（Wangら、Gene Ther., 9:381, 2002）が、こちらも生理的発現制御を行うまでには至っていない。

本発明の方法により、ドーパミン合成に関わる酵素群又はGDNFゲノム領域を導入したHACベクターを作製することが可能である。そして、患者への投与方法を特に限定するものではないが、上記HACベクターを、ヒト細胞（例えばヒト正常神経幹／前駆細胞）へ移入し、罹患者へ移植することにより、生理的組織特異的発現による導入遺伝子産物の補充が可能である。

## 20 (F-4) 糖尿病

インスリン依存型糖尿病において、組換え体タンパク質製剤投与による治療が行われている。慢性疾患では定期的な投与のため病院への通院が必要であり、患者のQOLの障害となっている。また、組換え体タンパク質製剤の製造には多大なコストがかかり、その結果として高額な医療費負担が生じることも課題の一つとなっている。インスリンの血中濃度は至適範囲がせまいため、多すぎても少なすぎても副作用が生じ、時には生命の危険に至る場合がある。また、遺伝子治療の研究がなされているが、体内におけるインスリン濃度のコントロールが課題となっている（森谷ら、蛋白質 核酸 酵素、40巻：2764、1995、共立

出版)。

本発明の方法によりインスリンゲノムを導入したHACベクターを作製し、患者への投与方法を特に限定するものではないが、ヒト細胞、例えば産生組織の細胞、へ移入し、生理的／組織特異的に発現・供給することが可能である。また上記により定期的な通院治療回数を減らし患者のQOLを向上させることが可能である。

(F-5) 適用対象疾患を特に限定するものではないが、例えば脳腫瘍、末梢動脈疾患(虚血など)、慢性間接リュウマチ、動脈再狭窄、肘部トンネル症候群、冠動脈疾患、アルツハイマー病、潰瘍、骨盤骨折、腎疾患、悪性腫瘍、などにおいて、本発明の方法に従って、疾患治癒に必要と考えられる物質をコードする遺伝子を導入したHACベクターを作製し、患者への投与方法を特に限定するものではないが、例えばヒト細胞へ移入して患者へ移植するなどによって、欠損分子の補充・相補を行うことが可能である。

15

### 実施例

本発明を以下の実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕ヒト21番染色体長腕遠位の削除によるHACベクターの作製

20 (1) テロメア短縮のためのコンストラクト構築

ヒト21番染色体の長腕遠位を削除するためのテロメアトランケーションベクター(ターゲティングベクター)は、PBS-TEL/Puro (Kuroiwa, Nucleic Acids Res., 26:3447, 1998)を用いた。GenBankデータベースより得たヒト21番染色体長腕遠位の塩基配列(登録番号AL163204)から、テロメアトランケーションベクター挿入の標的配列を設計した。これをPCR増幅するための、制限酵素BamHIの認識配列を付加したプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す:

#21telF1: 5'-CGCGGATCCAGAGAGAGCCTGGAATGCCTGGTAGTGT(配列番号1)

#21telR1 : 5' - CGCGGATCCCCAGTGCCCTGAGATCTTGTGATTTCTC (配列番号 2)

ヒト 21 番染色体を保持する D T 4 0 雑種細胞は、同染色体を保持するマウス A 9 雑種細胞 (Shinohara, Hum Mol Genet, 10: 1163, 2001) を染色体供与細胞  
5 としてマイクロセル法により調製した。染色体受容細胞である D T 4 0 は Japanese Collection of Research Bioresources (J C R B) に登録番号 J C R B 2 2 2 1 として登録されており、入手可能である。以下に調製法の概略を記す。

はじめに約  $1 \times 10^8$  個の A 9 (# 2 1 n e o) 細胞からマイクロセルを調製した。25 cm<sup>2</sup> 遠心用フラスコ (コースター) 12 本に細胞密度が 60 ~ 70 %  
10 飽和程度まで培養した A 9 (# 2 1 n e o) 細胞をコルセミド ( $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$ , デメコルシン, 和光純薬) を含む培養液 (10 % C S,  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  G 4 1 8, D M E M) 中で 72 時間培養して微小核を誘導した。実施例において、D M E M はインビトロジェン製のものを用いた。培地を除いた後、予め保温 ( $34^\circ\text{C}$ ) しておいたサイトカラシン B (D M E M 中に  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ , シグマ)  
15 溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、 $34^\circ\text{C}$ , 8000 rpm, 1 時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地 (D M E M, シグマ) に懸濁して回収し、フィルターで濾過して精製した。精製したマイクロセルは  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のフィトヘムアグルチニン P (Phytohemagglutinin-P, シグマ) を含む D M E M 4 ml に再懸濁した。D T 4  
20 0 細胞は、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のポリ L リジン (Poly-L-Lysine, シグマ) でコーティングした 6 穴クラスター (ヌンク) の 2 穴に  $1 \times 10^8$  個を播種した後 1 時間静置し、あらかじめ底面に付着させておく。これにマイクロセル懸濁液を加え 3 分間静置したのち上清を除き、50 % (w/v) ポリエチレングリコール 1500 (ロッシュダイアグノスティクス) で 1 分間処理した。融合細胞を無血清 D M E M 1  
25 2 ml に懸濁し、6 穴プレートの 4 穴に播いて 24 時間培養した後、 $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の G 4 1 8 を含む培地で約 2 週間選択培養し、出現した薬剤耐性のコロニーを単離した。

上記 D T 4 0 雑種細胞を培養し、細胞から Puregene DNA Isolation kit (Gentra



System 社) を用いてゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型とし、上記のプライマーを用いて組換えの標的配列をPCR法により増幅した。鋳型として約0.1  $\mu$ gのゲノムDNAを使用し、Innis ら (PCR実験マニュアル, HBJ 出版局, 1991) に従い、サーマルサイクラーはGeneAmp9700 (Applied Biosystems 社) を使用してPCRを行った。Taq ポリメラーゼはLA Taq (宝酒造) を用い、  
5 反応条件は、95℃2分の後、変性95℃30秒、アニーリング/伸長68℃6分を35サイクル行った。増幅産物を制限酵素BamHI (ニッポンジーン) で消化して、突出末端をもつ約5kbのDNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、精製した。これをPBS-TEL/PuroプラスミドのBamHI  
10 サイトにクローニングした。最終的なPBS-TEL/Puroコンストラクトのサイズは約10.6kbである。テロメアトランケーションベクター、標的配列、及び相同組換えにより生じる染色体アレルを図1に示した。

## (2) トランスフェクション及びpuro耐性クローンの単離

15 PBS-TEL/Puroコンストラクトを制限酵素EcoRI消化により線状化DNAとし、ヒト21番染色体を保持するDT40雑種細胞に導入した。DT40雑種細胞 $1 \times 10^7$ を0.75mlのPBSに懸濁し、25  $\mu$ g DNA存在下でジーンバルサー (パイオラッド) を用いてエレクトロポレーションを行った。容量25  $\mu$ Fのコンデンサに750Vで印加し電極間距離4mmのエレクト  
20 ロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションした細胞を、10%牛胎仔血清 (FBS)、1%ニワトリ血清 (ChS) 及び50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノールを添加したDMEM培地 (インビトロジェン製) に懸濁し、96穴クラスター (ファルコン) 2枚に播種した。2日後に終濃度0.3  $\mu$ g/mlとなるようピューロマイシン (Puromycin dihydrochloride, シグマ) を加えた。  
25 2~3週間後には耐性コロニーが出現し、その頻度はDT40雑種細胞 $1 \times 10^7$ あたり平均17.8個であった。20回のトランスフェクションから合計356の薬剤耐性コロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。

### (3) 相同組換え体の選別とテロメア短縮の確認

#### (3-1) PCR解析

ピューロマイシン耐性株ゲノムDNAを鋳型としてヒト21番染色体上に存在する遺伝子及びSTSマーカー (D21S265, CBR, SIM2, D21S

5 268, D21S266, D21S1259) の存在をPCR法により検出した。

これらのSTSマーカーのプライマーオリゴヌクレオチドの配列は米国 National Center for Biotechnology Information のオンラインデータベース UniSTS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists>) において閲覧可能である。上記6種のSTSマーカーの登録番号は順にUniSTS: 7

10 6223, 45641, 54124, 22625, 54266, 53746である。

その他にGenBankデータベースより入手した塩基配列をもとに設計した遺伝子プライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

PRED65F : 5' - GCCTGGCATCTTCCTCAATA (配列番号3)

PRED65R : 5' - TTGCATGCCTGTGGTACTGT (配列番号4)

15 PRED3F : 5' - TCACAATCATGGGCTTTGAA (配列番号5)

PRED3R : 5' - CACGCAACCATTTGTTTCATT (配列番号6)

約0.1  $\mu$ gのゲノムDNAを鋳型として、はじめに上記8種のうち相同組換えによる切断部位の近位に位置するPRED3遺伝子と、遠位に位置するD21

20 S265マーカー及びD21S266マーカーの計3種についてPCR増幅

(Innis ら, 前記) を行った。テロメアトランケーションにより長腕遠位が削除された場合、PRED3遺伝子を保持しD21S265マーカー及びD21S2

66マーカーを保持しないことが予想される。耐性354クローンのうち24クローンにおいて予想される増幅結果が得られた。これら24クローンについては

25 残る7種のマーカーによるPCR増幅を行い、ヒト21番染色体の保持領域を確認した。以上の代表的な結果を図2に示す。図2には、左側にヒト21番染色体のGバンド像に基づく模式的な染色体地図を、またマーカーについてはどのバンドに位置するかを示した。3種のピューロマイシン耐性DT40株について、P

CRにより期待される増幅産物が検出されたマーカーは■で、検出されなかったマーカーを□で示した。DT40（#21）は、テロメアトランケーションを行う前の細胞である。

### 5 (3-2) サザンブロット解析

相同組換えの標的配列内にプローブを設定した（図1）。プローブは以下に示すオリゴヌクレオチドプライマー対を用い、ヒト21番染色体を保持するDT40雑種細胞のゲノムDNAを鋳型としてPCRにより増幅し、その後PCR増幅断片を単離及び精製した。

10 #21qtelF: 5' - TCACAGCCAGCAGAGGATTC（配列番号7）

#21qtelR: 5' - CACCTGCACAATGGCTCAAC（配列番号8）

1次スクリーニングで得た24クローンから抽出したゲノムDNA約10  $\mu$ gを制限酵素KpnI（宝酒造）により消化し、Ausubelら（Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994）に記された方法でサザンブロット解析を行った。<sup>32</sup>Pにより標識したプローブがハイブリダイズしたシグナルを、イメージアナライザーBAS2000（富士写真フィルム）により検出した。代表的な結果を図3に示す。塩基配列から予想される制限酵素断片長は相同組換え体で13.6 kb、野生型（非組換え体）で9.0 kbであり、候補クロー

20 ン24のうち、2クローンが相同組換え体であることを確認した。

### (3-3) 蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）

FISH解析は、松原ら（FISH実験プロトコール，秀潤社，1994）に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1（ギブコBRL）を用いて行った。

25 その結果、観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト21番染色体が検出された。代表的なFISH像を図4a及びbに示す。図4aにおいて白矢印はテロメアトランケーションを行う前の全長のヒト21番染色体を、図4bにおいて白矢印は長腕遠位を削除したヒト21番染色体断片を示している。宿主であるD

T 4 0 細胞の染色体との相対的な大きさから、ヒト 2 1 番染色体が短縮したことが確認された。

以上の実験より、得られたピューロマイシン耐性の 2 株が長腕削除により短縮したヒト 2 1 番染色体を保持することが確かめられた。

5

〔実施例 2〕 H A C ベクターにおけるヒト 2 1 番染色体長腕近位への l o x P 配列の挿入

(1) l o x P 挿入のためのコンストラクト構築

実施例 1 で作製したヒト人工染色体 (H A C) に l o x P 配列を挿入するための基本プラスミドには、p S F 1 (ライフテック) を用いた。L o x P 挿入部位であるヒト 2 1 番染色体長腕近位の塩基配列は G e n B a n k データベースより得た (登録番号 A L 1 6 3 2 0 3) 。相同組換えの 2 つの標的配列の増幅に用いたプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

- #21qEcoF : 5' - CCGGAATTCCTCTGGGTTTCTGGTGAAGC (配列番号 9)
- 10 #21qEcoR : 5' - CCGGAATTCTGTAGATCCTGCCATTGTGG (配列番号 1 0)
- #21qBaF : 5' - CGCGGATCCTTGGCTCCAAAAGGTACCAC (配列番号 1 1)
- #21qBaR : 5' - CGCGGATCCCTATCCTCGCCACTGTGTCC (配列番号 1 2)

ヒト 2 1 番染色体を保持する D T 4 0 雑種細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型として 2 つの標的配列を P C R により増幅した。それぞれを制限酵素 E c o R I (ニッポンジーン) ないし B a m H I (ニッポンジーン) で消化して、突出末端をもつ約 3 k b の DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、精製した。これらを p S F 1 プラスミドの E c o R I ないし B a m H I サイトにクローニングした。相同組換え体の選別に用いるプラストサイジン耐性遺伝子は、p C

20 M V / B s d (インビトロジェン) より制限酵素 X h o I (ニッポンジーン) 及び S a l I (ニッポンジーン) 消化により約 1. 3 k b の断片として切り出し、上記 p S F 1 コンストラクトの X h o I サイトにクローニングした。

最終的な p S F 1 コンストラクトのサイズは約 1 2. 4 k b である。ターゲット

ィングベクター、標的配列、及び相同組換えにより生じる染色体アレルを図 5 に示した。

(2) トランスフェクション及び b s r 耐性クローンの単離

- 5 p S F 1 コンストラクトを制限酵素 A p a I (ニッポンジーン) 消化により線状化し、長腕遠位を削除したヒト 2 1 番染色体を保持する D T 4 0 株 (D T 4 0 (# 2 1) p u r o - 3 3 9) に導入した。D T 4 0 雑種細胞を  $1 \times 10^7$  を 0.75 ml の P B S に懸濁し、 $10 \mu\text{g}$  DNA 存在下でジーンパルサー (バイオラッド) を用いてエレクトロポレーションを行った。容量  $25 \mu\text{F}$  のコンデンサに  
10 750 V で印加し、電極間距離 4 mm のエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションした細胞を 10 % 牛胎仔血清 (F B S)、1 % ニワトリ血清 (C h S)、 $50 \mu\text{M}$  2-メルカプトエタノールを添加した D M E M 培地 (インビトロジェン製) に懸濁し、96 穴クラスター (ファルコン) 3 枚に播種した。2 日後に終濃度  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるようブラストサイジン  
15 (Blasticidin S Hydrochloride、フナコシ) を加えた。2 ~ 3 週間後には耐性コロニーが出現し、その頻度は D T 4 0 雑種細胞  $1 \times 10^7$  あたり平均 5.8 個であった。14 回のトランスフェクションで得た計 82 のコロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。

20 (3) 相同組み換え体の選別

(3-1) サザンブロット解析

- 相同組換え体を選別するためのスクリーニングとしてサザンブロット解析を行った。相同組換えの標的配列の外側にプローブを設定した。プローブは次に記す  
オリゴヌクレオチドプライマー対を用い、ヒト 2 1 番染色体を保持する D T 4 0  
25 雑種細胞のゲノム DNA を鋳型として P C R により増幅、単離、精製した。

21LOX4869F : 5' - GTTGCAGAAAAGTAGACTGTAGCAA (配列番号 13)

21LOX5682R : 5' - TCTAAGGAACAAATCTAGGTCATGG (配列番号 14)

ブラストサイジン耐性クローンから抽出したゲノムDNA約10  $\mu$ gを制限酵素XbaI（ニッポンジーン）により消化し、サザンブロット解析を行った（図6A及びB）。プローブは<sup>32</sup>Pにより標識し、シグナルはイメージアナライザーBAS2000（富士写真フィルム）により検出した。図6Aにおいて左から1番目のレーンはloxPサイトを導入する前のヒト21番染色体を保持するDT40株、2番目のレーンは宿主のDT40細胞株、3番目以降のレーンはブラストサイジン耐性DT40株を示す。塩基配列から予想される制限酵素断片長は相同組換え体で7.6 kb、野生型（非組換え体）で8.5 kbであり、ブラストサイジン耐性株82から合計3クローン（#60, #78, #79）の相同組換え体を見出した。

### （3-2）PCR解析

左右2つの標的配列（図5中、それぞれA及びBで示す）に対し、これらを夹んで染色体上とターゲティングベクター上にそれぞれオリゴヌクレオチドプライマー対を設計した。その位置は図5中に矢印で示した。その配列を以下に示す：

Left455F：5' - GGGCTAGCCATTAAAGCTGA（配列番号15）

Left638R：5' - AAAGGGAATAAGGGCGACAC（配列番号16）

Right958F：5' - GGTTTGTCCAACTCATCAATGTA（配列番号17）

Right1152R：5' - GTCAATTCACATAATTCCTATTCCTCAGT（配列番号18）

サザンブロット解析により見出した候補クローンからゲノムDNAを抽出してPCRを行い、塩基配列から予想されるサイズ（左側（A）3,283 bp及び右側（B）3,114 bp）の増幅産物を与えることを確認した。結果を図6Bに示す。

以上の（1）～（3）の実験により、得られたブラストサイジン耐性DT40細胞82株のうち3株が、相同組換えによりloxP配列が挿入されたヒト21番染色体部分断片（HACベクター）を保持することが確かめられた。

〔実施例 3〕 ヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターのハムスター細胞株への移入

(1) 微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として、実施例 1 及び 2 で得られた、長腕遠位を削除して 10  
x P 配列を挿入したヒト 21 番染色体に基づく HAC ベクターを保持する DT 4  
5 0 細胞 (DT 4 0 (# 2 1) b s d - 7 9) を用いた。染色体受容細胞としては  
チャイニーズハムスター由来細胞株 CHO-K 1 (ATCC より入手, 登録番号  
JCRB 9 0 1 8) を用いた。

はじめに約  $10^9$  個の DT 4 0 (# 2 1) b s d - 7 9 細胞からマイクロセルを  
調製した。細胞密度が 6 0 ~ 7 0 % 飽和程度まで培養した DT 4 0 (# 2 1) b  
10 s d - 7 9 細胞をコルセミド ( $0.075 \mu\text{g}/\text{ml}$ , デメコルシン, 和光純薬)  
を含む培養液 (1 0 % FBS, 1 % CHS,  $50 \mu\text{M}$  2-メルカプトエタノール,  
DMEM) 中で 1 2 ~ 1 5 時間培養して微小核を誘導した。遠心分離により細胞  
を回収して無血清 DMEM に再懸濁し、予めポリ L-リジンでコーティングした  
25  $\text{cm}^2$  遠心用フラスコ (コースター) 1 2 本に播種した。37℃ 1 時間静置  
15 することで細胞が付着したのち培養液を除去し、予め保温 (37℃) しておいた  
サイトカラシン B (DMEM 中に  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ , シグマ) 溶液を遠心用フラス  
コに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、34℃、8, 0 0  
0 rpm、1 時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地 (DMEM) に懸濁  
して回収し、フィルターで濾過して精製した。CHO-K 1 細胞を 8 0 % 飽和の  
20 状態まで培養した 6 cm 径ディッシュに精製した微小核細胞を加え PEG 溶液で  
融合した。4 8 時間後にトリプシン処理により細胞を分散し、プラストサイジン  
( $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む選択培地 (1 0 % FBS, F12) で培養した。約 2 週  
間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。  
1 2 回の微小核細胞融合から計 4 株のプラストサイジン耐性 CHO 株を得た。

(2) 移入染色体の確認

(2-1) PCR 法

移入染色体の確認を PCR 法により行った。ヒト 21 番染色体長腕近位のマー

カーPRED65及びPRED3遺伝子（実施例1の（3）参照）の検出を試みた。プラストサイジン耐性のCHO細胞4株のすべてにおいて、2種のマーカー配列の増幅を確認した。

5       （2-2）蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション（FISH）

FISH解析は、松原ら（FISH実験プロトコール，秀潤社，1994）に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1（ギブコBRL）を用いて行った。プラストサイジン耐性のCHO株のうちの2株（CHO（#21）bsd79-1及びCHO（#21）bsd79-3）について解析したところ、いずれも観  
10 察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト21番染色体が検出された。代表的なFISH像を図7a及びbに示す。図7aにおいてテロメアトランケーションを行う前の全長のヒト21番染色体を、図7bは長腕遠位を削除したヒト21番染色体断片を示している。宿主であるCHO細胞の染色体との相対的な大きさから、短縮したヒト21番染色体がCHO細胞に移入されたことが確認された。  
15 以上の（1）及び（2）の実験から、得られたプラストサイジン耐性CHO株は長腕遠位を削除しloxP配列を挿入したヒト21番染色体部分断片（HACベクター）を保持することが確かめられた。

〔実施例4〕ヒト21番染色体由来HACベクターのヒト細胞株への移入、及び  
20 ヒト21番染色体由来HACベクターの培養細胞における安定性の確認

（1）微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として、実施例3で得られた、長腕遠位を削除してloxP配列を挿入したヒト21番染色体に基づくHACベクターを保持するCHO細胞（CHO（#21）bsd-79-1）を用いた。染色体受容細胞としてはヒト  
25 線維肉腫細胞株HT1080（ATCCより入手，登録番号CCL-121）を用いた。はじめに約 $10^7$ 個のCHO（#21）bsd-79-1細胞からミクロセルを調製した。すなわち、 $25\text{ cm}^2$ 遠心用フラスコ（コースター）6本に細胞密度が60～70%飽和程度まで培養したCHO（#21）bsd-79-



1細胞をコルセミド ( $0.075 \mu\text{g}/\text{ml}$ , デメコルシン, 和光純薬) を含む  
培養液 ( $10\% \text{ FBS}$ ,  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$  プラストサイジン,  $\text{F12}$ ) 中で48時間  
培養して微小核を誘導した。培地を除いた後、予め保温 ( $37^\circ\text{C}$ ) しておいたサ  
イトカラシンB ( $\text{DMEM}$ 中に  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ , シグマ) 溶液を遠心用フラスコ  
5 に満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、 $34^\circ\text{C}$ ,  $8,000$   
 $\text{rpm}$ , 1時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地 ( $\text{DMEM}$ ) に懸濁し  
て回収し、フィルターで濾過して精製した。HT1080細胞を80%飽和の状  
態まで培養した6cm径ディッシュに精製した微小核細胞を加えPEG溶液で融  
合した。48時間後にトリプシン処理により細胞を分散し、プラストサイジン ( $8$   
10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む選択培地 ( $10\% \text{ CS}$ ,  $\text{DMEM}$ ) で培養した。約2週間の  
選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。2  
回の微小核細胞融合から計12のプラストサイジン耐性HT1080株を得た。

## (2) 移入染色体の確認

### 15 (2-1) PCR法

移入染色体は、プラストサイジン耐性遺伝子のPCR増幅により確認した。用  
いたオリゴヌクレオチドプライマーの配列を次に示す。

Bsd2687F:  $5' - \text{CAACAGCATCCCCATCTCTG}$  (配列番号19)

Bsd2891R:  $5' - \text{GCTCAAGATGCCCTGTTCT}$  (配列番号20)

20 プラストサイジン耐性のHT1080細胞12株のすべてににおいて、耐性遺  
伝子配列の増幅を確認した。

### (2-2) 染色体解析

染色体解析は、黒木ら (細胞工学ハンドブック, 羊土社, 1992) に記され  
25 た方法に従い、ギムザ染色により行った。プラストサイジン耐性のHT1080  
株のうち4株 (HT1080 (#21) bsd79-1-3, 6, 11, 14)  
について約20の分裂中期染色体像を解析した。プラストサイジン耐性株では、  
親株のHT1080には認められず、内在の21番染色体よりサイズの小さいミ

ニ染色体が観察された。

以上の（１）及び（２）の実験から、得られたプラストサイジン耐性HT1080株は長腕遠位を削除し10xP配列を挿入したヒト21番染色体部分断片（HACベクター）を保持することが確かめられた。

### （３）非選択培養条件下での長期継代培養

長腕遠位を削除したヒト21番染色体の培養細胞における安定性を確認するために、非選択条件下で長期継代培養を行った。用いたのは先に記載したニワトリ細胞株（DT40（#21）bsd-79）、ヒト細胞株（HT1080（#21）bsd79-1-3, 6, 11, 14）である。ニワトリ細胞株用の非選択培養液は10%FBS, 1%ChS, 50 $\mu$ M 2-メルカプトエタノールを加えたDMEMであり、選択培養液はこれにプラストサイジン8 $\mu$ g/ml（DT40（#21）bsd-79の場合）を添加した。ヒト細胞株用の非選択培養液は10%CSを加えたDMEMであり、選択培養液はこれにプラストサイジン4 $\mu$ g/mlを添加した。ニワトリ細胞株は1.5 $\times 10^7$ 細胞を10cm径ディッシュに播種し、1日後に細胞を計数して再び1.5 $\times 10^7$ 細胞を10cm径ディッシュに播種した。ヒト細胞株は5.0 $\times 10^5$ 細胞を10cm径ディッシュに播種し、3日後に細胞を計数して再び5.0 $\times 10^5$ 細胞を10cm径ディッシュに播種した。ニワトリ細胞株は培養開始から21日、42日、63日、84日、105日及び126日後に、ヒト細胞株は10日及び20日後にそれぞれ細胞を回収し、染色体標本作製した。

### （４）染色体解析

ニワトリ細胞における人工染色体の検出は、松原ら（FISH実験プロトコル, 秀潤社, 1994）に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1（ギブコBRL）を用いたFISH法により行った。間期核500個においてヒト染色体を有無を観察し、保持率を算出した。ヒト細胞における人工染色体の検出は、

黒木ら（細胞工学ハンドブック，羊土社，1992）に記された方法に従いギムザ染色法により行った。分裂中期染色体像20個においてミニ染色体の有無を観察して保持率を算出し、4クローンの平均値を出した。その結果を表1に示す。

5

表1: #21 ΔqHACの安定性

宿主細胞	細胞集団倍加数	HAC保持率(%)	
		薬剤選択なし	薬剤選択あり
DT40	118	99	100
	236	99	100
HT1080	10	100	93
	22	97	98

ヒト21番染色体部分断片は、DT40細胞内では非選択培養条件下で分裂回数200回を越えても安定に保持されていた。また分裂中期の染色体像100個を観察して細胞あたりのヒト染色体数を数えたところ、例外なく1本が認められた。一方HT1080細胞株の培養は継続中であるが、現時点（分裂回数22回）ではヒト21番染色体部分断片は選択培養条件で安定に保持されている。また分裂中期の染色体像を観察したところ、細胞あたり1ないし2本の染色体部分が認められた。

15 以上の（3）及び（4）の実験により、ヒト21番染色体の長腕遠位を削除した部分断片はDT40細胞株及びHT1080細胞株において非選択培養条件で安定に保持されること、また細胞あたりのコピー数は維持されていることが明らかとなった。

20 【実施例5】ヒト21番染色体由来HACベクターへのGFP遺伝子挿入

図8に、ヒト21番染色体由来HACベクターへGFP遺伝子を挿入する方法を示した。実施例1～4に記載のように、テロメアトランケーションにより長腕遠位を削除し、長腕近位にloxPサイトを導入したヒト21番染色体由来HA

Cベクターを用意した。一方でloxP配列を含むGFP発現プラスミドを準備し、Cre組換え酵素を一過性に発現させることでloxP配列間の部位特異的組換え反応により人工染色体に挿入することとした。組換え挿入体の選別は、G418耐性の獲得（プロモーター分断型のneo遺伝子発現ユニットの再構成）を指標とした。

(1) loxP配列を含むGFP発現プラスミドの構築

GFP発現ベクターPEGFP-C1（クロンテック）を制限酵素GblI及びBamHI（ニッポンジーン）で消化して4.7kbのDNA断片を単離／精製し、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造）により自己環状化した。大腸菌DH5αの形質転換により組換えプラスミドを単離し、マルチクローニングサイト内のGblIからBamHIまでの51bpを欠失したプラスミド（PEGFP-C1Δ）を得た。このPEGFP-C1Δを鋳型とし、EGFP遺伝子の発現ユニットをPCRにより増幅した。

GenBankのデータベースより入手した塩基配列（アクセッション番号U55763）をもとに作製したプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

EcoGFP5 : 5' - GGCCGAATTCCGTATTACCGCCATGCAT（配列番号21）

BamGFP3 : 5' - CCGGGATCCCACAACACTAGAATGCAGTG（配列番号22）

増幅したEGFP遺伝子の発現ユニットの両端を制限酵素EcoRI及びBamHI（ニッポンジーン）で消化して突出末端とし、loxP配列とhCMVプロモーターを備えたプラスミドベクターPBS226（ライフテック）のEcoRI/BamHIサイトにクローニングした。

(2) トランスフェクション及びG418耐性クローンの単離

実施例3で作製したヒト21番染色体由来HACベクターを保持するCHO細胞（CHO（#21）bsd79-1）をトリプシン処理し、 $5 \times 10^6$ 細胞を0.8mlのリン酸バッファー（PBS）に懸濁した。10μgのPBS226

／EGFPプラスミドと20  $\mu$ gのCre酵素発現ベクターPBS185（ライ  
フテック）存在下でジーンパルサー（バイオラッド）を用いてエレクトロポレー  
ションを行った。容量25  $\mu$ Fのコンデンサに750 Vで印加し電極間距離4 m  
mのエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションし  
5 た細胞を10%牛胎児血清（FBS）を添加したイーグルF12培地（以下F1  
2という；インビトロジェン製）を含む100 mm組織培養用プラスチックシャ  
ーレ（ファルコン）10枚に播種した。2日後に800  $\mu$ g/mlのG418  
（GENETICIN, シグマ）と8  $\mu$ g/mlのプラストサイジン（Blasticidin S  
Hydrochloride, フナコシ）を含む培地と置き換えた。2～3週間後には耐性コロ  
10 ニーが出現し、その頻度はCHO細胞 $5 \times 10^6$ あたり20個であった。コロニ  
ーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。

（3）ヒト21番染色体由来HACベクターに挿入されたGFP遺伝子の発現  
単離したG418／プラストサイジン耐性CHO株を蛍光顕微鏡下で観察した。  
15 その結果19クローンでGFPの発現が確認された。代表的な蛍光顕微鏡像を図  
9に示す。

#### （4）相同組換え体の確認

相同組換え体を確認するため、サザンブロット解析を行った。サザンブロット  
20 解析はG418耐性遺伝子及びGFP遺伝子の一部をプローブとして、制限酵素  
EcoRIないしBamHI（ニッポンジーン）で処理した約5  $\mu$ gのゲノムD  
NAに対して行った。GFPプローブはプラスミドPEGFP-C1（クロンテ  
ック）を制限酵素NheI及びGblII（ニッポンジーン）により消化して得  
た849 bpの断片を調製して用いた。G418耐性遺伝子のプローブはプラス  
25 ミドpSV2neoを制限酵素GblII及びSmaI（ニッポンジーン）によ  
り消化し、1000 bpの断片を調製して用いた。プローブは $^{32}$ Pにより標識し、  
シグナルはイメージアナライザーBAS2000（富士写真フィルム）により検  
出した。図10にその結果の一例を示す。図10ではEcoRI消化したDNA

をneoプロンプトによって検出している。レーン1はインサート挿入前のDT40株、レーン2以降はG418耐性DT40株を示す。挿入前のアレルでは5.7 kb、挿入後のアレルでは6.9 kbのシグナルが検出される。

- 5 以上の(1)～(4)の実験より、解析したG418耐性株19株のうち18株で相同組換えのアレルが検出された。このうち5株では相同組換えのアレルに加えて組換え前のアレルが、1株でランダム挿入のアレルが検出された。したがって目的とする組換え体が得られた頻度は12/19(63%)となる。

#### 〔実施例6〕ヒト21番染色体短腕の削除

##### 10 (1) テロメア短縮のためのコンストラクト構築

- ヒト21番染色体の短腕遠位を削除するためのテロメアトランケーションベクターはPBS-TEL/Puro (Kuroiwa, Nucleic Acids Res., 26:3447, 1998)を改変して構築した。PBS-TEL/Puroよりピューロマイシン耐性遺伝子の発現ユニット1.7 kbを制限酵素Not Iの断片として取り除き、末端を15 T4 DNA Polymerase (DNA Blunting kit, 宝酒造)により平滑化した(PBS-TELベクター)。PGKhygro/ $\Delta$ LT20を制限酵素Cla I及びSma I(ニッポンジーン)により消化し、PGKプロモーター制御下のハイグロマイシン耐性遺伝子発現ユニットを1.8 kbの断片として単離・精製し、PBS-TELベクターにクローニングした(PBS-TEL/Hygro)。

- 20 GenBankデータベースより得たヒト21番染色体長腕近位の塩基配列(登録番号AL163201)から、テロメアトランケーションベクター挿入の標的配列を設計した。これをPCR増幅するための、制限酵素Spe IないしBam H Iの認識配列を付加したプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

Spe31203 : 5' - GCACTAGTCTGGCACTCCTGCATAAACA (配列番号23)

- 25 Bam36192 : 5' - CTAAGGATCCATTTCAGCCTGTGGAATCA (配列番号24)

ヒト21番染色体を保持するDT40雑種細胞から抽出したゲノムDNAを鋳型として標的配列をPCRにより増幅した。これを制限酵素Spe I及びBam

H I (ニッポンジーン) で消化して、突出末端をもつ約 5 k b の DNA 断片をア  
ガロースゲル電気泳動により分離し、精製した。これを P B S - T E L / H y g  
r o プラスミドの X b a I / B a m H I サイトにクローニングした。最終的な P  
B S - T E L / H y g r o コンストラクトのサイズは約 5. 8 k b である。テロ  
5 メアトランケーションベクター、標的配列、及び相同組換えにより生じる染色体  
アレルを図 1 1 に示した。

## (2) トランスフェクション及びハイグロマイシン耐性クローンの単離

P B S - T E L / H y g r o コンストラクトを制限酵素 B a m H I (ニッポン  
10 ジーン) により消化して線状化し、長腕遠位を削除して l o x P サイトを組み込  
んだヒト 2 1 番染色体を保持する D T 4 0 雑種細胞 (D T 4 0 (# 2 1) b s d  
7 9) に導入した。D T 4 0 雑種細胞  $1 \times 10^7$  を 0. 7 5 m l の P B S に懸濁  
し、2 5  $\mu$  g DNA 存在下でジーンパルサー (パイオラッド) を用いてエレクト  
ロポレーションを行った。容量 2 5  $\mu$  F のコンデンサに 7 5 0 V で印加し電極間  
15 距離 4 m m のエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレー  
ションした細胞を 1 0 % 牛胎仔血清 (F B S) 、1 % ニワトリ血清 (C h S) 及  
び 5 0  $\mu$  M 2 -メルカプトエタノールを添加した D M E M 培地 (インビトロジェ  
ン製) に懸濁し、9 6 穴クラスター (ファルコン) 5 枚に播種した。2 日後に終  
濃度 1. 5 m g / m l となるようハイグロマイシン (Hygromycin-B, 和光純薬)  
20 を加えた。2 ~ 3 週間後には耐性コロニーが出現した。計 2 回のトランスフェク  
ションから合計 6 3 個の薬剤耐性コロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行  
った。

## (3) 相同組換え体の選別とテロメア短縮の確認

### 25 (3-1) P C R 解析

ハイグロマイシン耐性 D T 4 0 株から相同組換え体を選別するための 1 次スク  
リーニングとして P C R 解析を行った。ハイグロマイシン耐性株より抽出したゲ  
ノム DNA 約 0. 1  $\mu$  g を鋳型としてヒト 2 1 番染色体の短腕近位に位置する S

TSマーカー (pCHB, D21S188, D21S275) を増幅した。その  
代表的な結果を図12に示す。図12には、左側にヒト21番染色体のGバンド  
像に基づく模式的な染色体地図を、またマーカーについてはどのバンドに位置す  
るかを示した。ハイグロマイシン耐性DT40株について、PCRにより期待さ  
5 れる増幅産物が検出されたマーカーは■で、検出されなかったマーカーを□で示  
した。DT40 (#21) は、テロメアトランケーションを行う前の細胞である。  
テロメアトランケーションにより短腕遠位が削除された場合、D21S275を  
保持し、D21S188及びpCHBを保持しないことが予想される。D21S  
188ないしpCHBのいずれかを増幅しない45株を選別し、サザンプロット  
10 解析を行った。

### (3-2) サザンプロット解析

相同組換えの標的配列内にプローブを設定した。プローブは以下に示すオリゴ  
ヌクレオチドプライマー対を用い、ヒト21番染色体を保持するDT40雑種細  
15 胞のゲノムDNAを鋳型としてPCRにより増幅、単離、精製した。

#21p91203 : 5' - CTGGCACTCCTGCATAAACA (配列番号25)

#21p91976 : 5' - TCTGTGTTCCCCCTTCTCTGA (配列番号26)

ハイグロマイシン耐性株から抽出したゲノムDNA約10  $\mu$ gを制限酵素H i  
20 n d I I I (ニッポンジーン) により消化し、サザンプロット解析を行った。塩  
基配列から予想される制限酵素断片長は相同組換え体で5.8 kb、野生型 (非  
組換え体) で1.9 kbであり、1次スクリーニングで見出した候補45クロー  
ンのうち2クローンが相同組換え体であることを確認した (図13)。

### 25 (3-3) PCR法

組換えの標的部位を挟んだ配列をPCRにより増幅した。ヒト21番染色体上  
とターゲティングベクター上に設定したプライマーオリゴヌクレオチドの配列を  
以下に示す：



Hyg968 : 5' - AAGTACTCGCCGATAGTGGAAACC (配列番号 27)

#21p96705 : 5' - AGTTAGCCTACCTTTTGGCCATCC (配列番号 28)

増幅産物のサイズは 5.9 kb であり、これを制限酵素 *Nsi*I により消化すると、1.4 kb、2.6 kb 及び 1.9 kb の断片が生じると予想される (図 11)。サザンブロット解析で相同組換えアレルが確認された 2 クローンでのみ PCR 増幅が認められ、制限酵素消化による部分断片の生成を確認した (図 14)。

#### (3-4) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)

10 FISH 解析は、松原ら (FISH 実験プロトコール, 秀潤社, 1994) に記された方法に従い、ヒト特異的プローブ *Cot*1 (ギブコ BRL) を用いて行った。その結果観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト 21 番染色体が検出された (図 15 a 及び b)。

15 以上の (1) ~ (3) の実験より、得られたハイグロマイシン耐性 63 株のうち 2 株が短腕削除により短縮したヒト 21 番染色体を保持することが確かめられた。

#### 〔実施例 7〕ヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターへの EPO 遺伝子挿入

20 実施例 5 に記載の GFP 遺伝子の場合と同様にして、ヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターへヒト EPO 遺伝子を挿入する。実施例 1 ~ 4 に記載のように、テロメアトランケーションにより長腕遠位を削除し、長腕近位に *loxP* サイトを導入したヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターを用意した。一方で *loxP* 配列を含むヒト EPO 発現プラスミドを準備し、*Cre* 組換え酵素を一過性に発現させることで *loxP* 配列間の部位特異的組換え反応により人工染色体に挿入することとした。組換え挿入体の選別は、G418 耐性の獲得 (プロモーター分断型の *neo* 遺伝子発現ユニットの再構成) を指標とした。

#### (1) *loxP* 配列を含むヒト EPO 発現プラスミド pLN1-EPO の構築

プラスミド構築に用いたプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

SV40polyANp1 : 5' - CGG GAT CCC TCG AGC GAG ACA TGA TAA GAT ACA TTG ATG -3'

(配列番号 29)

SV40polyARp1 : 5' - GGA AGA TCT TCC TAA TCA GCC ATA CCA CAT TTG TAG AGG -3'

5 (配列番号 30)

これらのプライマーは、プラスミドベクター pSTneoB (加藤ら、Cell Struct Funct, 12:575-580, 1987) の塩基配列を基にして作製した。

CMVNp3 : 5' - CGG AAT TCC GGA CAT TGA TTA TTG ACT AGT TAT TAA TAG -3' (配

10 列番号 31)

CMVRp1 : 5' - CGG GAT CCC GGG TGT CTT CTA TGG AGG TCA AAA CAG -3' (配列  
番号 32)

これらのプライマーは、pBS226のCMVプロモーター塩基配列を基にし  
て作製した。

15

hEPONp1 : 5' -CGG GAT CCC GGC CAC CAT GGG GGT GCA CGA ATG TC -3' (配列番  
号 33)

hEPORp1 : 5' -CGC TCG AGC GCT ATC TGT CCC CTG TCC TGC AGG -3' (配列番号  
34)

20 これらのプライマーは、GenBankより入手した塩基配列 (アクセシヨ  
ン番号 I05397) を基に作製した。

pSTneoBを鋳型としてSV40polyANp1 (配列番号 29) 及びSV40polyARp1  
(配列番号 30) を用いてPCR増幅したSVポリA付加ユニットの両端を制限  
25 酵素BamHI及びBglII (宝酒造) で消化して突出末端とし、loxP配  
列とhCMVプロモーターを備えたプラスミドベクターpBS226 (ライフテ  
ック) のBamHIサイトにクローニングした。これをpBS226-pAとした。

次に、pBS226を鋳型としてCMVNp3 (配列番号 31) 及びCMVRp1 (配列番

号 3 2) を用いて P C R 増幅した C M V プロモーターユニットの両端を制限酵素 E c o R I 及び B a m H I (宝酒造) で消化して突出末端とし、 p B S 2 2 6 - p A の E c o R I - B a m H I サイト間へクローニングした。これを p L N 1 とした。

- 5      最後に、ヒト E P O c D N A を鋳型として h E P 0 N p 1 (配列番号 3 3) 及び h E P 0 R p 1 (配列番号 3 4) を用いて P C R 増幅したヒト E P O コード領域の両端を制限酵素 B a m H I 及び X h o I (宝酒造) で消化して突出末端とし、 p L N 1 の B a m H I - X h o I サイト間へクローニングした。これを p L N 1 - E P O とした。

10      (2) トランスフェクション及び G 4 1 8 耐性クローンの単離

- 実施例 3 で作製したヒト 2 1 番染色体由来 H A C ベクターを保持する C H O 細胞 (C H O (# 2 1) b s d 7 9 - 1) をトリプシン処理し、  $5 \times 10^6$  細胞を 0. 8 m l のハンス平衡塩溶液 (H B S S) に懸濁した。上記 (1) で作製した p L N 1 - E P O ベクター  $10 \mu g$  と C r e 酵素発現ベクター p B S 1 8 5
- 15      (ライフテック)  $10 \mu g$  の存在下でジーンパルサー (バイオラッド) を用いてエレクトロポレーションを行った。容量  $500 \mu F$  のコンデンサに  $450 V$  で印加し、電極間距離 4 m m のエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションした細胞を 10 % 牛胎児血清 (F B S) を添加したイーグル F 1 2 培地 (以下 F 1 2 という; インビトロジェン製) を含む 4 8 穴組織培養用
- 20      プラスチックシャーレ (ファルコン) 4 枚に播種した。2 日後に  $800 \mu g / m l$  の G 4 1 8 (GENETICIN、インビトロジェン) と  $8 \mu g / m l$  のプラストサイジン (Blasticidin S Hydrochloride, フナコシ) を含む培地と置き換えた。2 ~ 3 週間後には耐性コロニーが出現し、その頻度は C H O 細胞  $5 \times 10^6$  あたり 2 8 個であった。コロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。この細胞を以
- 25      後 K H 2 1 E 細胞と称する。

(3) ヒト 2 1 番染色体由来 H A C ベクターに挿入された E P O 遺伝子の発現

ヒト E P O 遺伝子の発現は、培養上清中に産生されるヒト E P O タンパク質を

酵素結合免疫吸着検定法（ELISA法）により定量した。

- 単離したG418／プラスタサイジン耐性KH21E細胞19クローン中6クローンについて、各々 $1 \times 10^5$ 細胞を10%FBS添加した800  $\mu$ g/mlのG418と8  $\mu$ g/mlのプラスタサイジンを含むF12培地2mlをいれた56穴組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン）に播種した。コンフレント到達後、10%FBSを添加したF12培地2mlに置き換え、6日間培養し上清を回収した。ヒトEPO ELISAキット（Quantikine IVD Human EPO Immunoassay, R&D システム）により、培養上清中のヒトEPOを定量した。その結果を表2に示す。

10

表2

Clone No.	測定値 (mIU/ml)	CM 中の EPO 濃度	
		(IU/ml)	(ug/ml)
C13	16.4	1640	8.2
C15	17.1	1710	8.5
C17	29.5	2950	14.7
C18	41.1	4110	20.5
C21	16.6	1660	8.3
C22	23.9	2390	11.9

以上の結果から、6クローン全てにおいてヒトEPOの発現が確認された。

#### 15 (4) KH21E細胞により産生されたヒトEPOの生物活性

- 産生されたヒトEPOの生物活性について、ヒトEPO依存的増殖を示すヒト白血病細胞株UT7-EPO細胞（自治医科大学 小松 則夫 先生より入手）の増殖活性を指標にして解析した。KH21E細胞の2株（#C2及び#C18）について培養上清を表2の定量値を基にEPO終濃度0.01, 0.1, 1, 5, 20, 100 mIU/mlとなるように加えた10%FBSを添加したIMDM培地（インビトロジェン製）0.1mlをいれた96穴組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン）にUT7-EPO細胞 $5 \times 10^3$ を播種した。3日間培養後、細胞増殖測定キット（Cell Titer 96 Aqueous One S

olution Cell Proliferation Assay, プロメ  
ガ) により細胞増殖を解析した。

その結果を図 16 に示す。2 クローンの培養上清を添加した場合、ともに組換  
え体ヒト EPO タンパク質 (rhEPO; キリンビール) 添加時と同様の用量依  
5 存的な吸光度の増加が認められた (図 16、C2 及び C8)。

以上の結果から、培養上清中に産生されたヒト EPO は、組換え体ヒト EPO  
タンパク質と同等の生物活性を保持することが確認された。

#### 〔実施例 8〕 KH21E 細胞の移入染色体の確認

10 本実施例においては、実施例 7 の (2) において作製された KH21E 細胞の  
各クローンについて、PCR 及び FISH 解析により移入染色体の確認を行った。

##### (1) PCR 解析

10xP サイト近傍に位置するヒト 21 番染色体長腕近位のマーカー PRED  
65 及び PRED3 遺伝子と遠位に位置する D21S265 マーカー (実施例 1  
15 の (3)、図 2 参照) について PCR 増幅を行った。10xP 配列間の部位特異  
的組換え反応によるヒト EPO 遺伝子挿入体は、PRED65 及び PRED3 遺  
伝子を保持し D21S265 マーカーを保持しないことが予想される。その結果、  
G418 耐性 CHO 細胞 22 クローンのうち 21 クローンにおいて予想された増  
幅が認められた。上記の 21 クローンに対して、ヒト 21 番染色体の短腕近位に  
20 位置する STS マーカー (pCHB, D21S187, D21S275) につき  
PCR 増幅を行った (実施例 6 の (3)、図 12 参照)。ヒト 21 番染色体由来  
HAC ベクターの短腕は残してあるので、全てのマーカーが保持されていること  
が予想される。その結果、15 クローンにおいて予想された増幅が認められた。

##### 25 (2) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 解析

FISH 解析は、松原ら (FISH 実験プロトコル, 秀潤社, 1994) に  
記された方法に従い、ヒト特異的プローブ Cot1 (ギブコ BRL) を用いて行  
った。上記 (1) の PCR 解析において全てのマーカーで予想される増幅を示し

たクローンのうち、8クローンについて解析したところ、いずれも観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト21番染色体が検出された。その結果を表3に示す。尚、表3中のクローンKH21は、実施例3で作製したヒト21番染色体由来HACベクターを保持するCHO細胞（CHO（#21）bsd79-1）を表す。

表3

クローン名	解析数 分裂像/間期核	細胞あたりの Cot-1 シグナル数 分裂像/間期核					保持率 (間期核) %
		0	1	2	3	4=<	
KH21	50/100	6/12	43/87	0/1	0/0	0/0	88
C1	18/50	0/2	18/40	0/7	0	0/1	96
C2	50/100	4/4	45/96	0/0	0/0	0/0	96
C3	20/50	4/2	16/43	0/5	0	0	96
C4	50/100	0/1	12/37	37/58	0/3	0/1	99
C11	50/100	4/2	40/85	6/13	0/0	0/0	98
C12	50/100	2/2	12/36	33/58	3/2	0/2	98
C13	50/100	0/1	13/35	32/58	0/2	5/4	99
C18	17/41	1/0	6/14	10/25	0	0/2	100

以上より、宿主であるCHO細胞の染色体との相対的な大きさから、短縮したヒト21番染色体がCHO細胞に移入されたことが確認された。

以上の（1）及び（2）の実験から、得られたG418耐性CHO株（KH21E細胞）は長腕遠位を削除したヒト21番染色体由来HACベクターを保持することが確かめられた。

〔実施例9〕ヒト21番染色体由来HACベクターへの複数EPO遺伝子挿入

本実施例においては、実施例7に記載のヒトEPO遺伝子の場合と同様にして、ヒト21番染色体由来HACベクターへ複数のヒトEPO遺伝子を挿入した。実施例1～4に記載のように、テロメアトランケーションにより長腕遠位を削除し、長腕近位にloxPサイトを導入したヒト21番染色体由来HACベクターを用

意した。一方で  $loxP$  配列を含むヒト  $EPO$  発現プラスミドを準備し、 $Cre$  組換え酵素を一過性に発現させることで  $loxP$  配列間の部位特異的組換え反応により人工染色体に挿入することとした。組換え挿入体の選別は、 $G418$  耐性の獲得（プロモーター分断型の  $neo$  遺伝子発現ユニットの再構成）を指標とした。

(1)  $loxP$  配列を含む 2 コピーヒト  $EPO$  発現プラスミド  $pLN1-EPO$  の構築

プラスミド構築に用いたプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

10  $EP0nF$  : 5' - GGA ATT CCG GGC CCA CGC GTG ACA TTG ATT ATT GA -3' (配列番号 35)

$SVpAR$  : 5' - GGA ATT CCT GAT CAT AAT CAG CCA TAC CAC ATT TG -3' (配列番号 36)

15  $EP0nF$  プライマー (配列番号 35) は、5' 側から順に  $EcoRI$ 、 $ApaI$ 、 $MluI$  の制限酵素認識配列及び  $CMV$  プロモーターの 5' 側部分配列を有し、 $pBS226$  の  $CMV$  プロモーター塩基配列を基にして作製した。 $SVpAR$  プライマー (配列番号 36) は、5' 側から順に  $EcoRI$ 、 $BclI$  の制限酵素認識配列及び  $SV40$  ポリ A 付加ユニットの 3' 側部分相補鎖配列を有し、プラスミドベク  
20 ター  $pSTneoB$  (加藤ら、*Cell Struct Funct*, 12:575-580, 1987) の塩基配列を基にして作製した。

実施例 7 にて作製したプラスミドベクター  $pLN1-EPO$  を  $EcoRI$  及び  $XbaI$  (宝酒造) で消化して得た  $CMV$  プロモーター、ヒト  $EPO$  遺伝子及び  $SV40$  ポリ A 付加ユニットを含む DNA 断片を鋳型として、 $EP0nF$  (配列番号 3  
25 5) 及び  $SVpAR$  (配列番号 36) プライマーを用いて、 $KOD-Plus$  (東洋紡) にて  $PCR$  増幅を行った。サーマルサイクラーは  $GeneAmp9700$  (*Applied Biosystems*) を使用した。 $PCR$  サイクルは、 $94^{\circ}C$  2 分の後、変性  $94^{\circ}C$  15 秒、アニーリング  $60^{\circ}C$  30 秒、及び伸長  $68^{\circ}C$  分 9

0秒を30サイクル行った。得られたDNA断片の両端を制限酵素EcoRI（宝酒造）で消化して突出末端とし、プラスミドベクターpLN1-EPOのEcoRIサイトにクローニングした。クローン化されたインサートDNA断片の塩基配列は、DNAシーケンサー（PRISM3700、Applied Biosystems）にて解析し、鋳型に用いたpLN1-EPO塩基配列の相当する部分と同一であることを確認した。得られたクローンのうち、CMVプロモーター及びヒトEPO遺伝子及びSV40ポリA付加ユニットが順方向に2コピー並んでいるプラスミドベクターをpLN1-EPO2とした。

10 (2) loxP配列を含む4コピーヒトEPO発現プラスミドpLN1-EPO4の構築

上記(1)にて作製したプラスミドベクターpLN1-EPO2をXbaI（宝酒造）で消化して直鎖化した後、KODポリメラーゼ（東洋紡）にて平滑末端化し、ApaI（宝酒造）で消化してCMVプロモーター及びヒトEPO遺伝子及びSV40ポリA付加ユニットを2コピー含むインサート用DNA断片を得た。

15 プラスミドベクターpLN1-EPO2をMluI（宝酒造）で消化した後KODポリメラーゼ（東洋紡）にて平滑末端化し、ApaI（宝酒造）で消化して出来たApaI-平滑末端化MluIサイト間へ上記のインサート用DNA断片をクローニングした。このヒトEPO遺伝子を4コピー含むプラスミドベクターを

20 pLN1-EPO4とした。

(3) トランスフェクション及びG418耐性クローンの単離

実施例3で作製したヒト21番染色体由来HACベクターを保持するCHO細胞（CHO（#21）bsd79-1）をトリプシン処理し、 $5 \times 10^6$ 細胞を

25 0.8mlのハンクス平衡塩溶液（HBSS）に懸濁した。上記(1)又は(2)で作製したpLN1-EPO2ベクター又はpLN1-EPO4ベクター10 $\mu$ gとCre酵素発現ベクターpBS185（ライフテック）10 $\mu$ gの存在下でジーンパルサー（パイオラッド）を用いてエレクトロポレーションを行った。容



- 量  $500\ \mu\text{F}$  のコンデンサに  $450\ \text{V}$  で印加し、電極間距離  $4\ \text{mm}$  のエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションした細胞を  $10\%$  牛胎児血清 (FBS) を添加したイーグル F12 培地 (以下 F12 という; インビトロジェン製) を含む  $48$  穴組織培養用プラスチックプレート (ファルコン)
- 5 5 枚に播種した。2 日後に  $800\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の G418 (GENETICIN、インビトロジェン) と  $8\ \mu\text{g}/\text{ml}$  のプラストサイジン (Blasticidin S Hydrochloride, フナコシ) を含む培地と置き換えた。2~3 週間後には耐性コロニーが出現し、その頻度は CHO 細胞  $5 \times 10^6$  あたり、pLN1-EPO2 を用いた場合には  $14$  個、pLN1-EPO4 を用いた場合
- 10 には  $24$  個であった。コロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。これらの細胞を以後、pLN1-EPO2 を用いて作製した細胞は KH21E2 細胞、pLN1-EPO4 を用いて作製した細胞は KH21E4 細胞と称する。

#### (4) ヒト EPO 遺伝子組換え挿入体の確認

- 15 組換え挿入体の選別は、ヒト 21 番染色体由来 HAC ベクター上の loxP 配列部位に挿入されたか否かを、loxP 配列部位を挟むようにヒト EPO 遺伝子供与ベクター由来配列上及び HAC ベクター上にプライマーを設計し、PCR 増幅により確認した。また、挿入されたヒト EPO 遺伝子のコピー数を、プラスミドベクター pBS226 上のプライマーと HAC ベクター上にプライマーを設計
- 20 し、PCR 増幅により確認した。

以下に PCR 増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマーの配列を示す:

SVpANp1:  $5' - \text{TTT GCA TGT CTT TAG TTC TAT GAT GA} - 3'$  (配列番号 37)

- このプライマーは、プラスミドベクター pSTneoB (加藤ら, Cell Struct Funct,  $12:575-580$ , 1987) の塩基配列を基にし
- 25 て作製した。

Neo Rp2:  $5' - \text{AGG TCG GTC TTG ACA AAA AGA AC} - 3'$  (配列番号 38)

このプライマーは、プラスミドベクター pSF1 (ライフテック) の neo 遺

伝子の塩基配列を基にして作製した。

M13RV : 5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC -3' (配列番号 39)

このプライマーは、プラスミドベクター pBS226 (ライフテック) の塩基  
5 配列を基にして作製した。

pLN1-EPO2 又は pLN1-EPO4 ベクター由来の SV40 ポリ A 付  
加配列領域に設計した SVpANp1 プライマー (配列番号 37) 及び HAC ベクター  
上の pSF1 由来のネオマイシン耐性遺伝子中に設計した NeoRp2 プライマー (配  
10 列番号 38) を用いて PCR 増幅を行った。組換え挿入体の場合は、pLN1-E  
PO2 又は pLN1-EPO4 ベクター由来の SV40 ポリ A 付加配列から l  
oxP 配列までと pSF1 由来の loxP 配列から neo 遺伝子の一部までを含  
む約 1.0 kbp の増幅が予想される。その結果、KH21E2 細胞 6 クローン  
及び KH21E4 細胞 6 クローン全てにおいて予想される増幅が確認された  
15 以上より、上記の 12 クローンは全て loxP 配列への組換え挿入体であるこ  
とが確認された。

次に、KH21E2 細胞 6 クローンについて、NeoRp2 プライマー (配列番号  
38) 及びプラスミドベクター pBS226 由来の M13RV プライマー (配列番号  
20 39) を用いて PCR 増幅を行った。組換え挿入体の場合は、pLN1-EPO  
2 ベクター由来の CMV プロモーター、ヒト EPO 遺伝子、及び SV40 ポリ A  
付加配列を 2 コピー含む領域から loxP 配列までと pSF1 由来の loxP 配  
列から neo 遺伝子の一部までを含む約 3.8 kbp の増幅が予想される。その  
結果、全てのクローンにおいて予想される増幅が確認された。  
25 以上より、上記の KH21E2 細胞 6 クローンには、CMV プロモーター、ヒ  
ト EPO 遺伝子及び SV40 ポリ A 付加配列を含むインサート DNA が 2 コピー  
挿入されていることが確認された。

(5) ヒト21番染色体由来HACベクターに挿入されたEPO遺伝子の発現  
ヒトEPO遺伝子の発現は、培養上清中に産生されるヒトEPOタンパク質を  
酵素結合免疫吸着検定法(ELISA法)により定量した。

(5-1) KH21E2細胞におけるEPO遺伝子の発現

- 5 単離したG418/プラスタサイジン耐性KH21E2細胞14クローン中6  
クローンについて、各々 $1 \times 10^5$ 細胞を10%FBS添加した800  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
のG418と8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプラスタサイジンを含むF12培地2mlをいれ  
た6穴組織培養用プラスチックプレート(ファルコン)に播種した。コンフレン  
ト到達後、10%FBSを添加したF12培地2mlに置き換え、6日間培養し  
10 上清を回収した。ヒトEPO ELISAキット(Quantikine IVD  
Human EPO Immunoassay, R&Dシステム)により、培養上  
清中のヒトEPOを $2 \times 10^{-5}$ 希釈にて定量した。その結果を表4に示す。

表4

Clone No.	測定値 (mIU/ml)	CM中のEPO濃度	
		(IU/ml)	( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
C1	29	1450	7.2
C7	40	2000	10.0
C10	27	1350	6.7
C11	42	2100	10.5
C13	25	1250	6.2
C14	39	1950	9.7
平均値	33	1683	8.3
標準偏差	7.4	373	1.8

15

(5-2) KH21E4細胞におけるEPO遺伝子の発現

- また、単離したG418/プラスタサイジン耐性KH21E4細胞24クロー  
ン中6クローンについて、各々 $1 \times 10^5$ 細胞を10%FBS添加した800  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
のG418と8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプラスタサイジンを含むF12培地2ml  
20 をいれた6穴組織培養用プラスチックシャーレ(ファルコン)に播種した。コン  
フレント到達後、10%FBSを添加したF12培地2mlに置き換え、6日間

培養し上清を回収した。ヒトEPO ELISAキット (Quantikine IVD Human EPO Immunoassay, R&Dシステム)により、培養上清中のヒトEPOを $2 \times 10^{-5}$ 希釈にて定量した。その結果を表5に示す。

5

表5

Clone No.	測定値 (mIU/ml)	CM 中の EPO 濃度	
		(IU/ml)	( $\mu$ g/ml)
C3	45	2250	11.2
C8	52	2600	13.0
C10	67	3350	16.7
C13	45	2250	11.2
C14	50	2500	12.5
C16	48	2400	12.0
平均値	51	2558	12.7
標準偏差	8.2	411	2.0

### (5-3) KH21E細胞におけるEPO遺伝子の発現

また、比較対照用として、実施例7において単離した、ヒトEPO遺伝子をヒト21番染色体由来HACベクター上に1コピー保持するG418/ブラストサイジン耐性KH21E細胞5クローンについて、各々 $1 \times 10^5$ 細胞を10% FBS添加した $800 \mu\text{g/ml}$ のG418と $8 \mu\text{g/ml}$ のブラストサイジンを含むF12培地2mlをいれた6穴組織培養用プラスチックプレート（ファルコン）に播種した。コンフレント到達後、10% FBSを添加したF12培地2mlに置き換え、6日間培養し上清を回収した。ヒトEPO ELISAキット (Quantikine IVD Human EPO Immunoassay, R&Dシステム)により、細胞培養上清中のヒトEPOを定量した。その結果を表6に示す。ただし、C1及びC4は $1 \times 10^{-4}$ 希釈にて、C9、C11及びC20は $1 \times 10^{-5}$ 希釈にて定量した。

20

表6

Clone No.	測定値 (mIU/ml)	CM 中の EPO 濃度	
		(IU/ml)	( $\mu$ g/ml)
C1	114	1140	5.7
C4	85	850	4.2
C9	7.6	760	3.8
C11	9.5	950	4.7
C20	7.2	720	3.6
平均値	—	884	4.4
標準偏差	—	168	0.8

以上の表4～6の結果から、KH21E2細胞6クローン及びKH21E4細胞6クローン全てにおいてヒトEPOの発現が確認された。またヒトEPOの発現は、ヒト21番染色体由来HACベクターへ挿入したヒトEPO遺伝子のコピー数と相関したことから、ヒト21番染色体由来HACベクターは挿入した遺伝子のコピー数依存的に発現制御出来ることが明らかになった。

〔実施例10〕長腕遠位及び短腕遠位削除ヒト21番染色体由来HACベクターへのEPO遺伝子挿入

実施例7に記載のヒトEPO遺伝子の場合と同様にして、ヒト21番染色体由来HACベクターへヒトEPO遺伝子を挿入する。実施例1～4及び6に記載のように、テロメアトランケーションにより長腕遠位を削除し、長腕近位に10xPサイトを導入し、かつテロメアトランケーションにより短腕遠位を削除したヒト21番染色体由来HACベクターを用意した。一方で10xP配列を含むヒトEPO発現プラスミドを準備し、Cre組換え酵素を一過性に発現させることで10xP配列間の部位特異的組換え反応により人工染色体に挿入することとした。組換え挿入体の選別は、G418耐性の獲得（プロモーター分断型のneo遺伝子発現ユニットの再構成）を指標とした。

(1) トランスフェクション及びG418耐性クローンの単離

後述する実施例 17 で作製したヒト 21 番染色体由来 H A C ベクターを保持する CHO 細胞 2 株：CHO # 21 h y g 4 及び CHO # 21 h y g 8（以後それぞれ H 4 細胞及び H 8 細胞と称する）に対しトリプシン処理を行い、それぞれ  $5 \times 10^6$  細胞を 0.8 ml のハンクス平衡塩溶液（HBSS）に懸濁した。実施例 7（1）で作製した p L N 1 - E P O ベクター  $10 \mu\text{g}$  と C r e 酵素発現ベクター p B S 1 8 5（ライフテック） $10 \mu\text{g}$  の存在下でジーンパルサー（パイオラッド）を用いてエレクトロポレーションを行った。容量  $500 \mu\text{F}$  のコンデンサに  $450 \text{V}$  で印加し、電極間距離  $4 \text{mm}$  のエレクトロポレーションセルを用いて放電した。エレクトロポレーションした細胞を 10% 牛胎児血清（FBS）を添加したイーグル F 1 2 培地（以下 F 1 2 という；インビトロジェン製）を含む 48 穴組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン）5 枚に播種した。2 日後に  $800 \mu\text{g}/\text{ml}$  の G 4 1 8（GENETICIN、インビトロジェン）及び  $8 \mu\text{g}/\text{ml}$  のブラストサイジン（Blasticidin S Hydrochloride, フナコシ）を含む選択培地と置き換えた。2～3 週間後には G 4 1 8 耐性及びブラストサイジン耐性コロニーが出現し、H 4 細胞又は H 8 細胞を宿主としたそれぞれから 24 個ずつコロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。これらの細胞を以後、H 4 を用いて作製した細胞は H 4 E 細胞、H 8 を用いて作製した細胞は H 8 E 細胞と称する。

## 20 （2）移入染色体の確認

### （2-1）PCR 解析

10xP サイト近傍に位置するヒト 21 番染色体長腕近位のマーカー P R E D 6 5 及び P R E D 3 遺伝子と遠位に位置する D 2 1 S 2 6 5 マーカー（実施例 1 の（3）、図 2 参照）について PCR 増幅を行った。10xP 配列間の部位特異的組換え反応によるヒト E P O 遺伝子挿入体は、P R E D 6 5 及び P R E D 3 遺伝子を保持し D 2 1 S 2 6 5 マーカーを保持しないことが予想される。その結果、H 4 E 細胞 22 クローンのうち 21 クローンにおいて予想された増幅が認められた。これら 21 クローンに対して、ヒト 21 番染色体の短腕近位に位置する S T

Sマーカー（pCHB, D21S187, D21S275）につきPCR増幅を行った（実施例6の（3）、図12参照）。ヒト21番染色体の短腕近位で短腕遠位を削除してあるので、pCHB及びD21S187マーカーを保持せず、D21S275マーカーを保持することが予測される。その結果、15クローンにおいて予想された増幅が認められた。

#### （2-2）蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）解析

FISH解析は、松原ら（FISH実験プロトコル、秀潤社、1994）に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1（ギブコBRL）を用いて行った。上記（2-1）のPCR解析において全てのマーカーについて予想される増幅を示したクローンのうち、6クローンについて解析したところ、いずれも観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト21番染色体が検出された。その結果を表7に示す。以上より、宿主であるCHO細胞の染色体との相対的な大きさから、短縮したヒト21番染色体がCHO細胞に移入されたことが確認された。

表7

クローン名	解析数 分裂像/間期核	細胞あたりの Cot-1 シグナル数 分裂像/間期核					保持率 (間期核) %
		0	1	2	3	4=<	
H4EC10	50/100	4/1	45/98	1/1	0/0	0/0	99
H4EC15	50/100	17/6	33/87	0/6	0/1	0/0	94
H4EC16	50/100	5/11	45/—	0/—	0/—	0/—	—
H4EC17	50/100	6/4	42/82	2/14	0/0	0/0	96
H4EC18	50/100	1/7	49/89	0/4	0	0	93
H4EC19	50/100	3/5	46/86	1/5	0/2	0/2	95

以上の（2-1）及び（2-2）の実験から、得られたG418耐性及びプラストサイジン耐性CHO株は長腕遠位及び短腕遠位を削除しloxP配列を挿入したヒト21番染色体由来HACベクターを保持することが確かめられた。

#### （3）ヒト21番染色体由来HACベクターに挿入されたEPO遺伝子の発現

ヒトEPO遺伝子の発現は、培養上清中に産生されるヒトEPOタンパク質を酵素結合免疫吸着検定法（ELISA法）により定量した。

### （３－１）H4E細胞におけるEPO遺伝子の発現

単離したG418及びブラストサイジン耐性H4E細胞24クローン中10ク  
 5 ローンについて、各々 $1 \times 10^5$ 細胞を10%FBS添加した $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ のG418と $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ のブラストサイジンを含むF12培地2mlをいれた6穴組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン）に播種した。コンフレント到達後、10%FBSを添加したF12培地2mlに置き換え、6日間培養し上清を回収した。ヒトEPO ELISAキット(Quantikine IVD Human EPO Immunoassay, R&Dシステム)により、培養上清中のヒトEPOを定量した。その結果を表8に示す。

表8

Clone No.	測定値 (mIU/ml)	CM 中の EPO 濃度	
		(IU/ml)	( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
C6	57	1140	5.7
C10	27	540	2.7
C11	46	920	4.6
C15	55	1100	5.5
C16	52	1040	5.2
C17	26	520	2.6
C18	49	980	4.9
C19	40	800	4.0
C20	54	1080	5.4
C21	53	1060	5.3

### （３－２）H8E細胞におけるEPO遺伝子の発現

また、単離したG418及びブラストサイジン耐性H8E細胞24クローン中6クローンについて、各々 $1 \times 10^5$ 細胞を10%FBS添加した $800 \mu\text{g}/\text{ml}$ のG418と $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ のブラストサイジンを含むF12培地2mlをいれた6穴組織培養用プラスチックシャーレ（ファルコン）に播種した。コンフ  
 20 レント到達後、10%FBSを添加したF12培地2mlに置き換え、6日間培養



し上清を回収した。ヒトEPO ELISAキット(Quantikine IVD Human EPO Immunoassay, R&Dシステム)により、培養上清中のヒトEPOを定量した。その結果を表9に示す。

5

表9

Clone No.	測定値 (mIU/ml)	CM 中の EPO 濃度	
		(IU/ml)	( $\mu$ g/ml)
C9	85	1700	8.5
C14	62	1240	6.2
C17	68	1360	6.8
C20	76	1520	7.6
C21	45	900	4.5
C23	62	1240	6.2

以上の表8及び9結果から、H4E細胞10クローン及びH8E細胞6クローン全てにおいてヒトEPOの発現が確認された。

- 10   〔実施例11〕ヒト21番染色体由来HACベクターのマウスA9細胞への移入  
       (1) 微小核細胞融合及び薬剤耐性クロンの単離

染色体供与細胞として、実施例17で得られた、長腕遠位を削除して10xP配列を挿入した後テロメアトランケーションにより短腕遠位を削除したヒト21番染色体由来HACベクターを保持するCHO細胞：CHO#21hyg4及び  
 15   CHO#21hyg8(以後それぞれH4細胞及びH8細胞と称する)を用いた。染色体受容細胞としてはマウスA9細胞(Oshimuraら、Environ. Health Perspect. 93:57, 1991, 登録番号JCRB0211)を用いた。はじめに約 $10^7$ 個のH4細胞からミクロセルを調製した。すなわち、 $25\text{ cm}^2$ 遠心用フラスコ(ヌンク)24本に細胞密度が60～70%飽和程度まで培養したH4又はH8細胞をコル  
 20   セミド( $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ , デメコルシン, 和光純薬)を含む培養液(20%FBS,  $800\text{ }\mu\text{g/ml}$  G418, F12)中で5日間培養して微小核を誘導した。培地を除いた後、予め保温( $37^\circ\text{C}$ )しておいたサイトカラシンB(DMEM中に $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ , シグマ)溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠

心容器に遠心用フラスコを挿入し、 $34^{\circ}\text{C}$ 、 $8,000\text{ rpm}$ 、1時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地 (DMEM) に懸濁して回収し、ポアサイズ  $8\text{ }\mu\text{m}$ 、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $3\text{ }\mu\text{m}$  のフィルター (ワットマン) を装着した SWINNE X-25 (ミリポア) を用いて濾過精製した。精製したマイクロセルは  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  のフィトヘムアグルチニン P (Phytohemagglutinin-P, Difco) を含む DMEM  $2\text{ ml}$  に再懸濁した。マウス A9 細胞を  $90\%$  飽和の状態まで培養した  $25\text{ cm}^2$  培養用フラスコ (ファルコン) に精製した微小核細胞を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  にて 15 分間静置した後、DMEM 中に PEG 1000 (終濃度  $50\%$  (W/V)、シグマ) 及び DMSO (終濃度  $7\%$  (W/V)、シグマ) を溶解し、ポアサイズ  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  フィルター (ザルトリウス) にて濾過した溶液で 1 分間かけて融合した。  $10\%$  FBS を含む DMEM 培地にて  $48$  時間培養した後、トリプシン処理により細胞を分散し、 $48$  穴組織培養用プラスチックプレート (ファルコン) 2 枚に播種した。2 日後にプラストサイジン ( $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) 又はハイグロマイシン ( $700\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、インビトロジェン) を含む選択培地 ( $10\%$  FBS, DMEM) と置き換えた。約 3 週間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。7 回の微小核細胞融合から 22 個の薬剤耐性コロニーを得た。上記で得られた細胞を以後 A9  $\Delta$  細胞と称する。

## (2) 移入染色体の確認

### 20 (2-1) PCR 解析

上記 (1) において得られたコロニーのうち 21 クローンについて解析した。10xP サイト近傍に位置するヒト 21 番染色体長腕近位のマーカー PRED 65 及び PRED 3 遺伝子と遠位に位置する D21S265 マーカー (実施例 1 の (3)、図 2 参照) について PCR 増幅を行った。HAC ベクター移入体は、PRED 65 及び PRED 3 遺伝子を保持し D21S265 マーカーを保持しないことが予想される。その結果、20 クローンにおいて予想された増幅が認められた。

次に、ヒト 21 番染色体の短腕近位に位置する STS マーカー (pCHB, D

21S187, D21S275)につきPCR増幅を行った(実施例6の(3)、  
図12参照)。ヒト21番染色体の短腕近位で短腕遠位を削除してあるので、p  
CHB及びD21S187マーカーを保持せず、D21S275マーカーを保持  
することが予測される。その結果、18クローンにおいて予想された増幅が確認  
5 された。

## (2-2) 薬剤選択培養

ヒト21番染色体由来HACベクター上に存在する薬剤耐性遺伝子、すなわち  
ハイグロマイシン耐性遺伝子(短腕遠位)及びブラストサイジン耐性遺伝子(長  
10 腕近位)が選択薬剤存在下で機能するかを指標として、各薬剤耐性遺伝子を含む  
領域が保持されているかを確認した。

上記(2-1)において予想される増幅を示した9クローンについて、6ウェ  
ル組織培養用プレート(ファルコン)各ウェルにて細胞密度が60~70%飽和  
程度までブラストサイジン(4 $\mu$ g/ml)を含む選択培地(10%FBS, D  
15 MEM)で培養した。PBS(インビトロジェン)で2回リンスした後、ハイグ  
ロマイシン(700 $\mu$ g/ml)のみ、又はブラストサイジン(4 $\mu$ g/ml)  
及びハイグロマイシン(700 $\mu$ g/ml)を含む培養液で1週間培養した。そ  
の結果を表10に示す。

表10

クローン名	Brasticidin (Bsd)	Hygromycin (Hyg)	Bsd + Hyg
A9 $\Delta$ 10	R	R	R
A9 $\Delta$ 11	R	R	R
A9 $\Delta$ 12	R	—	R
A9 $\Delta$ 13	R	R	R
A9 $\Delta$ 111	R	R	R
A9 $\Delta$ 113	R	R	R
A9 $\Delta$ 114	R	R	R
A9 $\Delta$ 115	R	R	R
A9 $\Delta$ 116	R	R	R

R;薬剤耐性  
-;試験データなし

5 以上より、全てのクローンにおいてプラストサイジン及びハイグロマイシン耐性を確認した。

### (2-3) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 解析

10 FISH解析は、松原ら (FISH実験プロトコール, 秀潤社, 1994) に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1 (ギブコBRL) を用いて行った。上記 (2-1) のPCR解析において全てのマーカーで予想される増幅を示し、上記 (2-2) においてプラストサイジン耐性かつハイグロマイシン耐性を示した2クローンについて解析したところ、観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト21番染色体が検出された。その結果を表11に示す。

15

表11

クローン名	解析数 分裂像/間期核	細胞あたりの Cot-1 シグナル数 分裂像/間期核				保持率 (間期核) %
		0	1	2	3	
A9Δ11	50/100	11/31	36/65	3/2	0/2	69
A9Δ12	50/100	2/11	47/87	0/2	1/0	89

以上より、宿主であるマウスA9細胞の染色体との相対的な大きさから、短縮したヒト21番染色体がマウスA9細胞に移入されたことが確認された。以後上記で得られた細胞2クローンをA9Δ11及びA9Δ12細胞と称する。

20

以上の (2-1) から (2-3) の実験より、得られたプラストサイジン及びハイグロマイシン耐性の2株が長腕及び短腕を削除したヒト21番染色体由来HACベクターを保持することが確かめられた。

25 [実施例12] マウスA9細胞へのヒトEPO遺伝子を挿入したヒト21番染色体由来HACベクター移入

## (1) 微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として、実施例10で得られた、ヒトEPO遺伝子を1コピー挿入した、長腕遠位を削除して10xP配列を挿入した後テロメアトランケーションにより短腕遠位を削除したヒト21番染色体由来HACベクターを保持する

5 CHO細胞のうち微小核形成能が高いクローン(H4E C10又はC15又はC16細胞)を用いた。染色体受容細胞としては、マウスA9細胞(0shimura ら、Environ. Health Perspect. 93:57, 1991, 登録番号JCRB0211)を用いた。はじめに約 $10^8$ 個のH4E C15又はC16細胞からマイクロセルを調製した。すなわち、 $25\text{ cm}^2$ 遠心用フラスコ(ヌンク)24本に細胞密度が60~70%

10 飽和程度まで培養したH4E C15又はC16細胞をコルセミド( $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ , デメコルシン, 和光純薬)を含む培養液(20%FBS,  $800\text{ }\mu\text{g/ml}$  G418, F12)中で4日間培養して微小核を誘導した。培地を除いた後、予め保温(37℃)しておいたサイトカラシンB(DMEM中に $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ , シグマ)溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコ

15 を挿入し、34℃, 8,000rpm, 1時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地(DMEM)に懸濁して回収し、ポアサイズ $8\text{ }\mu\text{m}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $3\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター(ワットマン)を装着したSWINNEX-25(ミリポア)を用いて濾過精製した。精製したマイクロセルは $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ 又は $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ のフィトヘムアグルチニンP(Phytohemagglutinin-P, Difco)

20 ifco)を含むDMEM2mlに再懸濁した。マウスA9細胞を90%飽和の状態まで培養した $25\text{ cm}^2$ 培養用フラスコ(ファルコン)に精製した微小核細胞を加え、37℃にて15分間静置した後、DMEM中にPEG1000(終濃度50%(W/V), シグマ)及びDMSO(終濃度7%(W/V), シグマ)を溶解し、ポアサイズ $0.22\text{ }\mu\text{m}$ フィルター(ザルトリウス)にて濾過した溶

25 液で1分間かけて融合した。10%FBSを含むDMEM培地にて48時間培養した後、トリプシン処理により細胞を分散し、48穴組織培養用プラスチックプレート(ファルコン)2枚に播種した。2日後にブラストサイジン( $6\text{ }\mu\text{g/ml}$ )又はG418( $600\text{ }\mu\text{g/ml}$ )を含む選択培地(10%FBS, DME

M) と置き換えた。約 3 週間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し以後の解析を行った。12 回の微小核細胞融合から 39 個の G418 耐性コロニーを得た。上記で得られた細胞を以後 AΔE 細胞と称する。

## 5 (2) 移入染色体の確認

### (2-1) PCR 解析

上記 (1) において得られたコロニーのうち 25 クローンについて解析した。

10xP サイト近傍に位置するヒト 21 番染色体長腕近位のマーカー PRED65 及び PRED3 遺伝子と遠位に位置する D21S265 マーカー (実施例 1 の

10 (3)、図 2 参照) について PCR 増幅を行った。10xP 配列間の部位特異的組換え反応によるヒト EPO 遺伝子挿入体は、PRED65 及び PRED3 遺伝子を保持し D21S265 マーカーを保持しないことが予想される。その結果、24 クローンにおいて予想された増幅が認められた。これら 24 クローンに対して、ヒト 21 番染色体の短腕近位に位置する STS マーカー (pCHB, D21S187, D21S275) につき PCR 増幅を行った (実施例 6 の (3)、図 12 参照)。ヒト 21 番染色体の短腕近位で短腕遠位を削除してあるので、pCHB 及び D21S187 マーカーを保持せず、D21S275 マーカーを保持することが予測される。その結果、19 クローンにおいて予想された増幅が確認された。

20

### (2-2) 薬剤選択培養

ヒト 21 番染色体由来 HAC ベクター上に存在する薬剤耐性遺伝子、すなわちハイグロマイシン耐性遺伝子 (短腕遠位)、ブラストサイジン耐性遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子 (長腕近位) が選択薬剤存在下で機能するかを指標として、

25 各薬剤耐性遺伝子を含む領域が保持されているかを確認した。

上記 (2-1) において予想される増幅を示したうち 7 クローンについて、6 ウェル組織培養用プレート各ウェルにて細胞密度が 60~70% 飽和程度まで G418 (600 µg/ml) 又はブラストサイジン (6 µg/ml) を含む選択

培地（１０％ＦＢＳ，ＤＭＥＭ）で培養した。ＰＢＳ（インビトロジェン）で２回リンスした後、ブラストサイジン及びハイグロマイシン（７００μｇ／ｍｌ）及びＧ４１８を含む培養液で１週間又は１０日間培養した。その結果を表１２に示す。

5

表12

クローン名	Brasticidin (Bsd)	Hygromycin (Hyg)	Genecitin(G)	Bsd + Hyg + G
AΔE1	R	R	R	R
AΔE2	R	R	R	R
AΔE4	—	—	R	R
AΔE5	R	—	—	R
AΔE8	R	R	R	R
AΔE16	—	R	R	R
AΔE18	—	R	R	R

R;薬剤耐性  
—;試験データなし

10

以上より、７クローンにおいてブラストサイジン及びハイグロマイシン及びＧ４１８の三重薬剤耐性を確認した。

### （２－３）蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）解析

15

ＦＩＳＨ解析は、松原ら（ＦＩＳＨ実験プロトコール，秀潤社，１９９４）に記された方法に従い、ヒト特異的プローブ *Cot1*（ギブコＢＲＬ）を用いて行った。上記（２－１）のＰＣＲ解析において全てのマーカーで予想される増幅を示した７クローンについて解析したところ、いずれも観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト２１番染色体が検出された。その結果を表１３に示す。

20

表13

クローン名	解析数 分裂像/間期核	細胞あたりの Cot-1 シグナル数 分裂像/間期核					保持率 (間期核) %
		0	1	2	3	4=<	
AΔE51	50/100	1/1	6/11	7/21	15/31	21/36	87
AΔE52	50/100	6/13	38/80	6/6	0/1	0	99
AΔE53	50/100	1/4	5/8	3/12	11/33	30/43	96
AΔE54	50/100	7/7	32/77	9/16	1/0	1/0	86
AΔE55	50/100	14/39	5/17	6/13	1/16	24/15	72
AΔE4	48/100	1/9	41/86	4/5	1/0	1/0	91
AΔE18	50/100	1/4	32/67	17/29	0	0	96

以上より、宿主であるマウスA9細胞の染色体との相対的な大きさから、短縮したヒト21番染色体がマウスA9細胞に移入されたことが確認された。

5

以上の(2-1)から(2-3)の実験より、得られた上記AΔE細胞が、ヒトEPO遺伝子を挿入し長腕及び短腕を削除したヒト21番染色体由来HACベクターを保持することが確かめられた。

#### 10 (3) ヒトEPO遺伝子組換え挿入体の確認

組換え挿入体の選別は、ヒト21番染色体由来HACベクター上のloxP配列部位に挿入されたか否かを、loxP配列部位を挟むようにヒトEPO遺伝子供与ベクター由来配列上及びHACベクター上にプライマーを設計し、PCR増幅により確認した。

- 15 AΔE細胞12クローンについて、実施例9(4)に示したNeoRp2プライマー(配列番号38)及びプラスミドベクターpBS226由来のM13RVプライマー(配列番号39)を用いてPCR増幅を行った。組換え挿入体の場合は、pLN1-EPOベクター由来のCMVプロモーター、ヒトEPO遺伝子、SV40ポリA付加配列を含む領域からloxP配列までとpSF1由来のloxP配列
- 20 からneo遺伝子の一部までを含む約2.3kbpの増幅が予想される。その結果、12クローン全てにおいて予想される増幅が確認された。



以上より、上記のAΔE細胞クローンは、CMVプロモーター及びヒトEPO遺伝子及びSV40ポリA付加配列を含むインサートDNAをコピー挿入されたヒト21番染色体由来HACベクターを保持することが確認された。

5 (4) ヒト21番染色体由来HACベクターに挿入されたEPO遺伝子の発現

ヒトEPO遺伝子の発現は、培養上清中に産生されるヒトEPOタンパク質を酵素結合免疫吸着検定法(ELISA法)により定量した。

10 単離したAΔE細胞4クローンについて、各々 $1 \times 10^5$ 細胞を10%FBS添加した $600 \mu\text{g/ml}$ のG418と $6 \mu\text{g/ml}$ のブラストサイジンを含むDMEM培地2mlをいれた6穴組織培養用プラスチックプレート(ファルコン)に播種した。コンフレント到達後、10%FBSを添加したF12培地2mlに置き換え、4日間又は5日間培養し上清を回収した。ヒトEPO ELISAキット(Quantikine IVD Human EPO Immunoassay, R&Dシステム)により、培養上清中のヒトEPOを希釈なしにて定量した。その結果を表14に示す。

15

表14

Clone No.	測定値 (mIU/ml)	CM中のEPO濃度 (pg/ml)
AΔE51	>200	>1000
AΔE53	192	910
AΔE4	>200	>1000
AΔE18	>200	>1000

20 AΔE51、AΔE4、AΔE18は、培養上清中のヒトEPO濃度が上記ヒトEPO ELISAキット(Quantikine IVD Human EPO Immunoassay, R&Dシステム)の検出限界濃度以上であった。

以上より、上記のAΔE細胞は、ヒトEPOタンパク質を産生することが確認された。

〔実施例13〕ヒト正常繊維芽細胞へのヒト14番染色体断片(SC20)移入

## (1) ヒト正常繊維芽細胞HFL-1へのSC20移入

## (1-1) 微小核細胞融合（プレート法）と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として、ヒト14番染色体断片（SC20）を保持するマウスA9細胞（C11-SC20細胞、Tomizuka ら, Nature Genet. (USA), 第16巻, p. 133-143, 1997 年）を用いた。染色体受容細胞としては、ヒト正常繊維芽細胞HFL-1（理化学研究所細胞材料開発室より入手、登録番号RCB0521）を用いた。はじめに約 $10^7$ 個の細胞からマイクロセルを調製した。すなわち、 $25\text{ cm}^2$ 遠心用フラスコ（ヌンク）12本に細胞密度が80～90%飽和程度まで培養したC11-SC20細胞をコルセミド（ $0.05\text{ }\mu\text{g/ml}$ , デメコルシン, 和光純薬）を含む培養液（20%FBS,  $800\text{ }\mu\text{g/ml}$  G418, DMEM）中で48時間培養して微小核を誘導した。培地を除いた後、予め保温（ $37^\circ\text{C}$ ）しておいたサイトカラシンB（DMEM中に $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ , シグマ）溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、 $34^\circ\text{C}$ , 8,000 rpm, 1時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地（DMEM）に懸濁して回収し、ポアサイズ $8\text{ }\mu\text{m}$ 、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $3\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター（ワットマン）を装着したSWINNEX-25（ミリポア）を用いて濾過精製した。精製したマイクロセルは $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ のフィトヘムアグルチニンP（Phytohemagglutinin-P, Difco）を含むDMEM 2 ml に再懸濁した。HFL-1細胞を90%飽和の状態まで培養した $25\text{ cm}^2$ 培養用フラスコ（ファルコン）に精製した微小核細胞を加え $37^\circ\text{C}$ にて15分間静置した後、DMEM中にPEG 1500（終濃度45%（W/V）、ロシュダイアグノステイクス）及びDMSO（終濃度10%（W/V）、シグマ）を溶解し、ポアサイズ $0.22\text{ }\mu\text{m}$ フィルター（ザルトリウス）にて濾過滅菌した溶液で1分間かけて融合した。15%FBSを含むDMEM培地にて48時間培養した後、トリプシン処理により細胞を分散し、コラーゲンIコート処理した48穴組織培養用プラスチックプレート（ファルコン）1枚に播種した。2日後にG418（ $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ ）を含む選択培地（15%FBS, DMEM）に置き換えた。約3週間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。3回の

微小核細胞融合から 21 個の G418 耐性コロニーを得た。

(1-2) 微小核細胞融合 (サスペンション法) と薬剤耐性クローンの単離

上記 (1-1) と同様にしてマイクロセルを調製及び精製し、6 ml の DMEM  
5 に再懸濁した。HFL-1 細胞を 90% 飽和の状態まで  $1.75 \text{ cm}^2$  培養用フラ  
スコ (ファルコン) にて培養し、トリプシン処理にて分散した後、DMEM で 2  
回洗浄し DMEM 7 ml に再懸濁した。上記マイクロセル懸濁液に上記 HFL-1  
細胞懸濁液を重層し遠心後、上清を除きペレットをタッピングにて懸濁し、0.  
5 ml の PEG 1500 (終濃度 50% (W/V)、ロシュダイアグノステイク  
10 ス) を加え、120 秒間にて融合した。DMEM 5 ml を 1 ml / 1 分 の速度で  
加え、さらに DMEM 5 ml 加えて  $37^\circ\text{C}$  10 分間静置後、遠心し 15% FBS  
を含む DMEM 培地に再懸濁してコラーゲン I コート処理した 48 穴組織培養用  
プラスチックプレート (ファルコン) 2 枚に播種した。2 日後に G418 ( $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む選択培地 (15% FBS, F12) に置き換えた。約 3 週  
15 間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。  
1 回の微小核細胞融合から 2 個の G418 耐性コロニーを得た。

(1-3) 移入染色体の確認

(1-3-1) PCR 解析

20 移入染色体は、SC20 上に存在する neo 遺伝子の PCR 増幅により確認し  
た。用いたオリゴヌクレオチドプライマーの配列を以下に示す：

421F : 5'- TTT GCA TGT CTT TAG TTC TAT GAT GA -3' (配列番号 40)

778R : 5'- AGG TCG GTC TTG ACA AAA AGA AC -3' (配列番号 41)

これらのプライマーは、プラスミドベクター pSTneoB (加藤ら、Cell  
25 Struct Funct, 12:575-580, 1987) の塩基配列を  
基にして作製した。

上記 (1-1) 及び (1-2) で得られた G418 耐性細胞 12 クローンにつ

いて、421F プライマー（配列番号 40）及び 778R プライマー（配列番号 41）を用いた PCR 増幅を行った。HAC ベクター移入体は、neo 遺伝子を保持することが予想される。その結果、全てのクローンにおいて予想された増幅が確認された。

5

### （1-3-2）染色体解析

染色体解析は、黒木ら（細胞工学ハンドブック，羊土社，1992）に記された方法に従い、ギムザ染色にて行った。G418 耐性の HFL-1 細胞のうち 2 クローンについて分裂中期染色体像を解析した。その結果、G418 耐性株では、  
10 親株の HFL-1 には認められず、内在の 14 番染色体よりサイズの小さいミニ染色体が観察された。

以上の（1-3-1）及び（1-3-2）の実験から、得られた上記の G418 耐性 HFL-1 株は SC20 を保持することが確かめられた。

15

### （2）ヒト正常繊維芽細胞 HUC-F2 への SC20 移入

#### （2-1）微小核細胞融合（プレート法）と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として、ヒト 14 番染色体断片（SC20）を保持するマウス A9 細胞（C11-SC20 細胞、Tomizuka ら，Nature Genet. (USA)，第 16  
20 巻，p. 133-143，1997 年）を用いた。染色体受容細胞としては、ヒト正常繊維芽細胞 HUC-F2（理化学研究所細胞材料開発室より入手、登録番号 RCB0436）を用いた。はじめに約  $10^7$  個の細胞からマイクロセルを調製した。すなわち、 $25\text{ cm}^2$  遠心用フラスコ（ヌンク）12 本に細胞密度が 80～90% 飽和程度まで培養した C11-SC20 細胞をコルセミド（ $0.05\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，デ  
25 メコルシン，和光純薬）を含む培養液（20% FBS， $800\text{ }\mu\text{g/ml}$  G418，DMEM）中で 48 時間培養して微小核を誘導した。培地を除いた後、予め保温（ $37^\circ\text{C}$ ）しておいたサイトカラシン B（DMEM 中に  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ，シグマ）溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを

挿入し、34℃、8,000rpm、1時間の遠心を行った。ミクロセルを無血清培地（DMEM）に懸濁して回収し、ポアサイズ8μm、5μm、3μmのフィルター（ワットマン）を装着したSWINNEX-25（ミリポア）を用いて濾過精製した。精製したミクロセルは50μg/mlのフィトヘムアグルチニン  
5 P（Difco）を含むDMEM2mlに再懸濁した。HUC-F2細胞を90%飽和の状態まで培養した25cm<sup>2</sup>培養用フラスコ（ファルコン）に精製した微小核細胞を加え37℃にて15分間静置した後、DMEM中にPEG1500（終濃度45%（W/V）、ロシュダイアグノステイクス）又はPEG1000（終濃度45%（W/V）、シグマ）、及びDMSO（終濃度10%（W/V）、シ  
10 グマ）を溶解し、ポアサイズ0.22μmフィルター（ザルトリウス）にて濾過滅菌した溶液で1分間かけて融合した。10%FBSを含むαMEM培地にて48時間培養した後、トリプシン処理により細胞を分散し、コラーゲンIコート処理した48穴組織培養用プラスチックプレート（ファルコン）1枚に播種した。  
2日後にG418（400μg/ml）を含む選択培地（10%FBS、αMEM）  
15 M）に置き換えた。約3週間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。4回の微小核細胞融合から8個のG418耐性コロニーを得た。

（2-2）微小核細胞融合（サスペンション法）と薬剤耐性クローンの単離  
20 上記（1-1）と同様にしてミクロセルを調製及び精製し、6mlのDMEMに再懸濁した。HUC-F2細胞を90%飽和の状態まで175cm<sup>2</sup>培養用フラスコ（ファルコン）にて培養し、トリプシン処理にて分散した後、DMEMで2回洗浄しDMEM7mlに再懸濁した。上記ミクロセル懸濁液に上記HUC-F2細胞懸濁液を重層し遠心後、上清を除きペレットをタッピングにて懸濁し、  
25 0.5mlのPEG1500（終濃度50%（W/V）、ロシュダイアグノステイクス）を加え、120秒間にて融合した。DMEM5mlを1ml/1分の速度で加え、さらにDMEM5ml加えて37℃10分間静置後、遠心し10%FBSを含むαMEM培地に再懸濁してコラーゲンIコート処理した48穴組織培

養用プラスチックプレート（ファルコン）2枚に播種した。2日後にG 4 1 8（400  $\mu$ g/ml）を含む選択培地（10% FBS， $\alpha$ MEM）に置き換えた。約3週間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。1回の微小核細胞融合から6個のG 4 1 8耐性コロニーを得た。

5

### （2－3）移入染色体の確認

移入染色体は、SC 2 0上に存在するneo遺伝子のPCR増幅により確認した。すなわち、上記（2－1）及び（2－2）で得られたG 4 1 8耐性細胞7クローンについて、421F プライマー（配列番号40）及び778R プライマー（配列番号41）を用いたPCR増幅を行った。HACベクター移入体は、neo遺伝子を保持することが予想される。その結果、全てのクローンにおいて予想された増幅が確認された。以上の実験から、得られたG 4 1 8耐性HUC-F 2株はSC 2 0を保持することが確かめられた。

15 （3）ヒト正常繊維芽細胞HF-19へのSC 2 0移入：微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として、ヒト14番染色体断片（SC 2 0）を保持するマウスA9細胞（C 1 1-SC 2 0細胞、Tomizuka ら、Nature Genet. (USA), 第16巻, p. 133-143, 1997年）を用いた。染色体受容細胞としては、ヒト正常繊維芽細胞HF-19（理化学研究所細胞材料開発室より入手、登録番号RCB 0 2 10）を用いた。はじめに約 $10^7$ 個の細胞からミクロセルを調製した。すなわち、25 cm<sup>2</sup>遠心用フラスコ（ヌンク）12本に細胞密度が80～90%飽和程度まで培養したC 1 1-SC 2 0細胞をコルセミド（0.05  $\mu$ g/ml, デメコルシン, 和光純薬）を含む培養液（20% FBS, 800  $\mu$ g/ml G 4 1 8, DMEM）中で48時間培養して微小核を誘導した。培地を除いた後、予め保温（37℃）しておいたサイトカラシンB（DMEM中に10  $\mu$ g/ml, シグマ）溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、34℃, 8,000 rpm, 1時間の遠心を行った。ミクロセルを無血清培地（D

MEM)に懸濁して回収し、ポアサイズ8  $\mu\text{m}$ 、5  $\mu\text{m}$ 、3  $\mu\text{m}$ のフィルター(ワットマン)を装着したSWINNEX-25(ミリポア)を用いて濾過精製した。精製したマイクロセルは50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のフィトヘムアグルチニンP(Phytohemagglutinin-P, Difco)を含むDMEM 2mlに再懸濁した。HF-19細胞を90%飽和の状態まで培養した25  $\text{cm}^2$ 培養用フラスコ(ファルコン)に精製した微小核細胞を加え37℃にて15分間静置した後、DMEM中にPEG 1500(終濃度45%(W/V)、ロシュダイアグノステイクス)及びDMSO(終濃度10%(W/V)、シグマ)を溶解し、ポアサイズ0.22  $\mu\text{m}$ フィルター(ザルトリウス)にて濾過滅菌した溶液で1分間かけて融合した。10%FBSを含む $\alpha$ MEM培地にて48時間培養した後、トリプシン処理により細胞を分散し、コラーゲンIコート処理した48穴組織培養用プラスチックプレート(ファルコン)1枚に播種した。2日後にG418(400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を含む選択培地(10%FBS,  $\alpha$ MEM)に置き換えた。約3週間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離した。1回の微小核細胞融合から1個のG418耐性コロニーを得た。

〔実施例14〕ヒト21番染色体由来HACベクターのヒト正常繊維芽細胞への移入

(1) 微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

(1-1) 染色体供与細胞としてヒト21番染色体由来HACベクター保持CHO細胞を用いた微小核細胞融合

染色体供与細胞として、実施例10で得られた、ヒトEPO遺伝子を1コピー挿入した、長腕遠位を削除してloxP配列を挿入した後テロメアトランケーションにより短腕遠位を削除し、Cre組換え酵素を一過性に発現させることでloxP配列間の部位特異的組換え反応によりヒトEPO遺伝子を挿入した、ヒト21番染色体由来HACベクターを保持するCHO細胞のうち微小核形成能が高いクローン(H4EC10細胞)を用いた。染色体受容細胞としては、ヒト正常繊維芽細胞HFL-1(理化学研究所細胞材料開発室より入手、登録番号RCB

0521)を用いた。はじめに約 $10^8$ 個のH4E C10細胞からマイクロセルを調製した。すなわち、 $25\text{ cm}^2$ 遠心用フラスコ(ヌンク)48本に細胞密度が60~70%飽和程度まで培養したH4E C10細胞をコルセミド( $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ , デメコルシン, 和光純薬)を含む培養液(20%FBS,  $800\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$  G418, F12)中で4日間培養して微小核を誘導した。培地を除いた後、予め保温( $37^\circ\text{C}$ )しておいたサイトカラシンB(DMEM中に $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ , シグマ)溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、 $34^\circ\text{C}$ , 8,000rpm, 1時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地(DMEM)に懸濁して回収し、ポアサイズ $8\text{ }\mu\text{m}$ 、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、 $3\text{ }\mu\text{m}$ のフィルター(ワットマン)を装着したSWINNEX-25(ミリポア)を用いて濾過精製した。精製したマイクロセルは $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のフィトヘムアグルチニンP(Difco)を含むDMEM2mlに再懸濁した。HFL-1細胞を90%飽和の状態まで培養した $25\text{ cm}^2$ 培養用フラスコ(ファルコン)に精製した微小核細胞を加え $37^\circ\text{C}$ にて15分間静置した後、DMEM中にPEG1500(終濃度45%(W/V)、ロシュダイアグノステイクス)及びDMSO(終濃度10%(W/V)、シグマ)を溶解し、ポアサイズ $0.22\text{ }\mu\text{m}$ フィルター(ザルトリウス)にて濾過滅菌した溶液で1分間かけて融合した。20%FBSを含むDMEM培地にて48時間培養した後、トリプシン処理により細胞を分散し、コラーゲンIコート処理した48穴組織培養用プラスチックプレート(ファルコン)1枚に播種した。2日後にG418( $300\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ )又はブラストサイジン( $6\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ )を含む選択培地(20%FBS, DMEM)に置き換えた。約3週間の選択培養を行った。出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。5回の微小核細胞融合から3個の薬剤耐性コロニーを得た。上記の細胞をHCΔE細胞と称する。

25

(1-2) 染色体供与細胞としてヒト21番染色体由来HACベクター保持マウスA9細胞を用いた微小核細胞融合

染色体供与細胞として、実施例12で得られた、ヒトEPO遺伝子を1コピー



挿入した、長腕遠位を削除してloxP配列を挿入した後テロメアトランケーションにより短腕遠位を削除し、Cre組換え酵素を一過性に発現させることでloxP配列間の部位特異的組換え反応によりヒトEPO遺伝子を挿入した、ヒト21番染色体由来HACベクターを保持するマウスA9細胞のうち微小核形成能  
5 が高いクローン（AΔ51又はAΔE5細胞）を用いた。染色体受容細胞としては、ヒト正常繊維芽細胞HFL-1（理化学研究所細胞材料開発室より入手、登録番号RCB0521）を用いた。はじめに約 $10^7$ 個の細胞からマイクロセルを調製した。すなわち、 $25\text{ cm}^2$ 遠心用フラスコ（ヌンク）12本に細胞密度が80～90%飽和程度まで培養したAΔ51又はAΔE5細胞をコルセミド（ $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、デメコルシン、和光純薬）を含む培養液（20%FBS、 $600\text{ }\mu\text{g/ml}$ G418、DMEM）中で72時間培養して微小核を誘導した。培地を除いた後、予め保温（37℃）しておいたサイトカラシンB（DMEM中に $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、シグマ）溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、34℃、8,000rpm、1時間の遠心を行った。  
10 ミクロセルを無血清培地（DMEM）に懸濁して回収し、ポアサイズ8μm、5μm、3μmのフィルター（ワットマン）を装着したSWINNEX-25（ミリポア）を用いて濾過精製した。精製したミクロセルは $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ のフィトヘムアグルチニンP（*Phytohemagglutinin-P*, *Difco*）を含むDMEM2mlに再懸濁した。HFL-1細胞を90%飽和の状態まで培養した $25\text{ cm}^2$ 培養用フラスコ（ファルコン）に精製した微小核細胞を加え37℃にて15分間静置した後、DMEM中にPEG1500（終濃度45%（W/V）、ロシュダイアグノステイクス）及びDMSO（終濃度10%（W/V）、シグマ）を溶解し、ポアサイズ0.22μmフィルター（ザルトリウス）にて濾過滅菌した溶液で1分間かけて融合した。20%FBSを含むDMEM培  
20 地にて48時間培養した後、トリプシン処理により細胞を分散し、コラーゲンIコート処理した48穴組織培養用プラスチックプレート（ファルコン）1枚に播種した。2日後にG418（ $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ ）又はブラストサイジン（ $6\text{ }\mu\text{g/ml}$ ）を含む選択培地（20%FBS、DMEM）に置き換えた。約3週間の

選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。10回の微小核細胞融合から27個の薬剤耐性コロニーを得た。上記の細胞を以後HΔE細胞と称する。

## 5 (2) 移入染色体の確認

移入染色体の確認は、ヒト21番染色体由来HACベクター上のneo遺伝子の有無を指標にしてPCR増幅により確認した。

以下にPCR増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマーの配列を示す。

1291F: 5'-CTA CCC GTG ATA TTG CTG AAG AG -3' (配列番号42)

10 1667R: 5'-ATT TGC ACT GCC GGT AGA ACT -3' (配列番号43)

これらのプライマーは、プラスミドベクターpSTneoB (加藤ら、Cell Struct Funct, 12:575-580, 1987) の塩基配列を基にして作製した。

1291F プライマー (配列番号42) 及び 1667R プライマー (配列番号43) を用いてPCR増幅を行った。上記ヒト21番染色体由来HACベクターを保持する場合は、neo遺伝子の一部を含む約0.4kbpの増幅が予想される。その結果、HΔE細胞5クローン全てにおいて予想される増幅が確認された。

以上より、上記のHΔE細胞は、上記ヒト21番染色体由来HACベクターを保持することが確認された。

20

## (3) ヒト21番染色体由来HACベクターに挿入されたEPO遺伝子の発現

ヒトEPO遺伝子の発現は、培養上清中に産生されるヒトEPOタンパク質を酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA法) により定量した。

単離したプラストサイジン耐性HΔE細胞3クローン及びG418又はプラ  
25 ストサイジン耐性HΔE細胞8クローンについて、20%FBS添加した300  
μg/mlのG418又は6μg/mlのプラストサイジンを含むDMEM培地  
0.5mlをいれた48穴組織培養用プラスチックプレート (ファルコン) に播  
種し、2日間又は3日間又は4日間培養し上清を回収した。ヒトEPO ELI

S Aキット (Quantikine IVD Human EPO Immunoassay, R & Dシステム) により、培養上清中のヒトEPOを希釈なしにて定量した。その結果を表15に示す。

表15

Clone No.	測定値 (mIU/ml)	CM 中の EPO 濃度 (pg/ml)
HΔE51-1	>200	>1000
HΔE51-2	46	230
HΔE51-3	130	650
HΔE51-4	62	310
HΔE5-1	>200	>1000
HΔE5-2	>200	>1000
HΔE5-3	>200	>1000
HΔE5-4	>200	>1000
HCAE1-1	30	150
HCAE1-2	57	285
HCAE3-1	46	230

5

HΔE51-1、HΔE5-1、HΔE5-2、HΔE5-3、HΔE5-4は、培養上清中のヒトEPO濃度が上記ヒトEPO ELISAキット (Quantikine IVD Human EPO Immunoassay, R & Dシステム) の検出限界濃度以上であった。

- 10 以上より、上記のHCAE細胞及びHΔE細胞クローンは、ヒトEPOタンパク質を産生することが確認された。

〔実施例15〕 ヒト21番染色体由来HACベクターへのEPO及びヒトテロメラーゼ (hTERT) 遺伝子挿入用ベクターの構築

- 15 (1) loxP配列を含むhTERT発現プラスミドpLN1-hTERTの構築

ヒトテロメラーゼ (hTERT) 遺伝子は、コード領域3399bpであり、5'側領域にG及びCが豊富な配列を含むため、コード領域の両端に設計したプライマーで全長をPCR増幅するには困難が予測された。それゆえ、コード領域

を3つ(1~800bp;以後5' hTERTと称する、679~1993bp;  
以後M-XhTRETと称する、1952~3339bp;以後3' hTRET  
と称する。ただし塩基配列位置は開始コドンATGのAを1として表した)に分  
けてそれぞれPCR増幅及びクローニングした後、各領域を連結する方法でhT  
5 ERT遺伝子をクローニングした。以下にその方法を示す。

#### (1-1) 5' hTERTのクローニング

プラスミドベクター構築に用いたプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下  
に示す:

- 10 hTERT Fw6: 5'- CTG CTG CGC ACG TGG GAA G -3' (配列番号44)  
hTERT Rv6: 5'- GGT CTG GCA GGT GAC ACC AC -3' (配列番号45)  
hTERT Fw1: 5'- GAA GAT CTT CAT CGA TCG GCC ACC ATG CCG CGC GC -3' (配  
列番号46)  
hTERT Rv7: 5'- TCA CTC GGT CCA CGC GTC CT -3' (配列番号47)
- 15 これらのプライマーは、GenBankより入手した塩基配列(アクセシヨ  
ン番号NM003219)を基に作製した。

HL-60cDNA (Marathon-Ready cDNA, CLONT  
ECH) 1ngを鋳型として、hTERT Fw6 (配列番号44) 及びhTERT Rv6 (配列  
20 番号45) をそれぞれ終濃度0.4  $\mu$ Mにて、LA Taq (宝酒造) 2.5ユ  
ニットを用いて50  $\mu$ lの反応液にてPCR増幅を行った。サーマルサイクラー  
はGeneAmp9600 (Applied Biosystems)を使用した。  
PCRサイクルは、98℃10分の後、変性98℃30秒、アニーリング及び伸  
長72℃5分を3サイクル、変性98℃30秒、アニーリング及び伸長70℃5  
25 分を2サイクル、変性98℃30秒、アニーリング及び伸長68℃5分を35サ  
イクル、にて行った。さらにこのPCR産物2  $\mu$ lを鋳型として、hTERT Fw1 (配  
列番号46) 及びhTERT Rv7 (配列番号47) をそれぞれ終濃度0.4  $\mu$ Mにて、  
LA Taq (宝酒造) 2.5ユニットを用いて50  $\mu$ lの反応液にてPCR増

幅を行った。PCRサイクルは、98℃10分の後、変性98℃30秒、アニーリング及び伸長72℃5分を3サイクル、変性98℃30秒、アニーリング及び伸長70℃5分を2サイクル、変性98℃30秒、アニーリング及び伸長68℃5分を35サイクル、にて行った。その結果、約0.8kbのDNA断片を得た。

- 5 この約0.8kbのDNA断片をQIAQUICK PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した後、KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡) にて両端を平滑末端とし、さらにBglII (宝酒造) にて消化して5'側を突出末端とし、5'hTERTインサート用DNA断片を得た。そしてプラスミドベクターpLN1-EPOをXhoI (宝酒造) にて消化した後、KOD DNAポリメラーゼ (東洋紡) にて両端を平滑末端とし、さらにBamHI (宝酒造) にて消化しヒトEPO遺伝子を除去して得られたBamHIー平滑末端サイトに5'hTERTインサート用DNA断片をクローニングした。宿主大腸菌にはXL-10Gold (STRATAGENE) を用いた。クローン化された5'hTERTインサートDNA断片の塩基配列は、DNAシーケン
- 10 15 サー (PRISM3700、Applied Biosystems) にて解析し、GenBankより入手した塩基配列の相当する部分と同一であることを確認した。以上より得られたプラスミドベクターをpLN1-5'hTERTとした。

20 (1-2) M-XhTERTのクローニング

プラスミドベクター構築に用いたプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

- hTERT Fw8-2 : 5'- AGT GCC AGC CGA AGT CTG CC -3' (配列番号48)  
hTERT 5' XhoIRv3 : 5'- GCA GCT GAA CAG TGC CTT C -3' (配列番号49)  
25 hTERT Fw8-1 : 5'- AGG ACG CGT GGA CCG AGT GA -3' (配列番号50)

これらのプライマーは、GenBankより入手した塩基配列 (アクセッション番号NM003219) を基に作製した。

HL-60 cDNA (Marathon-Ready cDNA, CLONTECH) 0.25 ng を鋳型として、hTERT Fw8-2 (配列番号 48) 及び hTERT 5' XhoIRv3 (配列番号 49) をそれぞれ終濃度 0.4  $\mu$ M にて、LA Taq (宝酒造) 2.5 ユニットを用いて 25  $\mu$ l の反応液にて PCR 増幅を行った。PCR サイクルは、98℃ 5 分の後、98℃ 15 秒・55℃ 30 秒・72℃ 90 秒を 40 サイクル、にて行った。さらにこの PCR 産物 1  $\mu$ l を鋳型として、hTERT Fw8-1 (配列番号 50) 及び hTERT 5' XhoIRv3 (配列番号 49) をそれぞれ終濃度 0.4  $\mu$ M にて、LA Taq (宝酒造) 2.5 ユニットを用いて 25  $\mu$ l の反応液にて PCR 増幅を行った。サーマルサイクラーは GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) を使用した。PCR サイクルは、98℃ 5 分の後、変性 98℃ 15 秒、アニーリング 55℃ 30 秒、及び伸長 72℃ 90 秒を 40 サイクル、にて行った。その結果、約 1.2 kb の DNA 断片を得た。

この約 1.2 kb の DNA 断片を QIAQUICK PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した後、MluI 及び XhoI (宝酒造) にて消化して突出末端とし、プラスミドベクター pLN1-EPO2 の MluI-XhoI サイトへクローニングした。宿主大腸菌には、XL-10Gold (STRATAGENE) を用いた。クローン化された M-XhTERT インサート DNA 断片の塩基配列は、DNA シーケンサー (PRISM 3700, Applied Biosystems) にて解析し、GenBank より入手した塩基配列の相当する部分と同一であることを確認した。以上より得られたプラスミドベクターを pLN1-M-XhTERT とした。

### (1-3) 3' hTERT のクローニング

プラスミドベクター構築に用いたプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す：

AP1: 5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC -3' (配列番号 51)

このプライマーは、Marathon-Ready cDNA (CLONTECH) 添付のものを使用した。

hTERT 3' XhoIFw : 5' - CCG AGC GTC TCA CCT CGA GGG TGA AGG CAC TGT TC -3'  
(配列番号 5 2)

5 hTERT 3' XhoIFw2 : 5' - ATG GAC TAC GTC GTG GGA GCC AGA -3' (配列番号 5 3)

hTERT Rv1 : 5' - GTC GAC GCT AGC TCA GTC CAG GAT GGT CTT GAA GT -3' (配列番号 5 4)

これらのプライマーは、GenBankより入手した塩基配列（アクセッション番号NM003219）を基に作製した。

10

HL-60 cDNA (Marathon-Ready cDNA, CLONT ECH) 0.1 ngを鋳型として、hTERT 3' XhoIFw2 (配列番号 5 3) 及び AP1 (配列番号 5 1) をそれぞれ終濃度 0.3  $\mu$ Mにて、KOD-Plus- (東洋紡) 0.5ユニットを用いて25  $\mu$ lの反応液にてPCR増幅を行った。サーマルサイクラーはGeneAmp 9700 (Applied Biosystems) を使用した。PCRサイクルは、94℃2分の後、変性94℃15秒、アニーリング60℃30秒、及び伸長68℃3分を30サイクル、にて行った。さらにこのPCR産物1  $\mu$ lを鋳型として、hTERT 3' XhoIFw (配列番号 5 2) 及び hTERT Rv1 (配列番号 5 4) をそれぞれ終濃度 0.3  $\mu$ Mにて、KOD-Plus- (東洋紡) 0.5ユニットを用いて25  $\mu$ lの反応液にてPCR増幅を行った。PCRサイクルは、98℃5分の後、変性98℃15秒、アニーリング55℃30秒、及び伸長72℃90秒を40サイクル、にて行った。その結果、約1.4 kbのDNA断片を得た。

25 この約1.2 kbのDNA断片をQIAQUICK PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した後、XhoI及びSalI (宝酒造) にて消化して突出末端とし、プラスミドベクターpLN1-EPOのXhoIサイトへクローニングした。宿主大腸菌には、XL-10Gold (STRATAGENE) を用いた。クローン化された3' hTERTインサートD

NA断片の塩基配列は、DNAシーケンサー（PRISM3700、Applied Biosystems）にて解析し、GenBankより入手した塩基配列の相当する部分と同一であることを、及びpLN1-EPO上CMVプロモーターの転写方向と逆向きに挿入されていることを確認した。以上より得られたプラスミドベクターをpLN1-3' hTERTとした。

(1-4) 5' hTERT、M-XhTRET及び3' hTRET領域の連結  
上記(1-3)にて得られたプラスミドベクターpLN1-3' hTERTを  
鑄型として、hTERT 3' XhoIFw（配列番号52）及びhTERT Rv1（配列番号54）  
10 をそれぞれ終濃度0.3  $\mu$ Mにて、KOD-Plus（東洋紡）0.5ユニットを用いて50  $\mu$ lの反応液にてPCR増幅を行った。サーマルサイクラーはGeneAmp9700（Applied Biosystems）を使用した。PCRサイクルは、94℃2分の後、変性94℃15秒、アニーリング60℃30秒、及び伸長68℃2分を30サイクル、にて行った。その結果、約1.4 kb  
15 のDNA断片を得た。

この約1.4 kbのDNA断片をQIAQUICK PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製した後、DNAシーケンサー（PRISM3700、ABI）にて解析し、GenBankより入手した塩基配列の相当する部分と同一であることを確認した。次に、この約1.4 kbのDNA断片をXhoI及びSalI（宝酒造）にて消化して突出末端とし、(1-2)にて得られたプラスミドベクターpLN1-M-XhTERTをMluI及びXhoI消化して得られたM-XhTERT領域とともにプラスミドベクターpLN1-EPO2のMluI-XhoIサイトからヒトEPO遺伝子を含む領域を除去したところヘクローニングした。宿主大腸菌には、XL-10Gold  
20 (STRATAGENE)を用いた。

得られたクローンのインサートDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサー（PRISM3700、Applied Biosystems）にて解析した結果、M-XhTERT領域内に塩基置換点変異を持ち、かつ3' hTERT領



域はGenBankより入手した塩基配列の相当する部分と同一であること、及びpLN1-EPO上CMVプロモーターの転写方向と順方向に挿入されていることを確認した。以上より得られたプラスミドベクターをEcoRI及びXhoIにて消化し、M-XhTERT領域を除去したところへ、(1-1)にて得られたpLN1-5' hTERTをEcoRI及びMluIにて消化し突出末端化したCMVプロモーター及び5' hTERT領域を、pLN1-M-XhTERTをMluI及びXhoI消化し突出末端化して得られたM-XhTERT領域とともにクローニングした。宿主大腸菌には、XL-10Gold (STRATAGENE)を用いた。これにより得られたプラスミドベクターをpLN1-hTERTとした。

(2) loxP配列を含むヒトEPO及びhTERT発現プラスミドpLN1-EPO-hTERTの構築

実施例9(1)にて作製したプラスミドベクターpLN1-EPO2をEcoRI消化して得られたCMVプロモーター、ヒトEPO遺伝子及びSV40ポリA付加ユニットを含むDNA断片を、実施例11にて作製したプラスミドベクターpLN1-hTERTのEcoRIサイトへクローニングした。これをpLN1-EPO-hTERTとする。

(3) loxP配列を含む2コピーヒトEPO及びhTERT発現プラスミドpLN1-EPO2-hTERTの構築

実施例9(1)にて作製したプラスミドベクターpLN1-EPO2をEcoRI消化して得られたCMVプロモーター、ヒトEPO遺伝子及びSV40ポリA付加ユニットを2コピー含むDNA断片を、上記(1)にて作製したプラスミドベクターpLN1-hTERTのEcoRIサイトへクローニングした。これをpLN1-EPO2-hTERTとする。

(4) loxP配列を含む4コピーヒトEPO及びhTERT発現プラスミドp

## LN1-EPO4-hTERTの構築

実施例9(2)にて作製したプラスミドベクターpLN1-EPO4をEcoRI消化して得られたCMVプロモーター、ヒトEPO遺伝子及びSV40ポリA付加ユニットを4コピー含むDNA断片を、上記(1)にて作製したプラスミドベクターpLN1-hTERTのEcoRIサイトへ転写順方向に4コピー並ぶようにクローニングした。これをpLN1-EPO4-hTERTとする。

## 〔実施例16〕ヒト21番染色体由来HACベクターへのEPO及びhTERT遺伝子挿入

10 実施例7に記載のヒトEPO遺伝子の場合と同様にして、ヒト21番染色体由来HACベクターへヒトEPO遺伝子及びhTERT遺伝子を挿入する。実施例1～4及び6に記載のように、テロメアトランケーションにより長腕遠位を削除し、長腕近位にloxPサイトを導入し、テロメアトランケーションにより短腕遠位を削除したヒト21番染色体由来HACベクターを用意した。一方でloxP配列を含むヒトEPO及びhTERT発現プラスミドを準備し、Cre組換え酵素を一過性に発現させることでloxP配列間の部位特異的組換え反応により人工染色体に挿入することとした。組換え挿入体の選別は、G418耐性の獲得(プロモーター分断型のneo遺伝子発現ユニットの再構成)を指標とした。

## 20 (1) トランスフェクション及びG418耐性クローンの単離

実施例11にて得られたヒト21番染色体由来HACベクターを保持するマウスA9細胞(A9Δ12細胞)を6ウェル組織培養用プラスチックプレート(ファルコン)1枚にて細胞密度が60～70%飽和程度までプラストサイジン(4μg/ml)を含む選択培地(10%FBS, DMEM)で培養した。実施例15の(2)で作製したpLN1-EPO-hTERTベクター及びCre酵素発現ベクターpBS185(ライフテック)の存在下、Fugene6(ロシュダイアグノステイクス)を用いて添付のプロトコールに従ってトランスフェクションを行った。48時間培養した後トリプシン処理にて分散し、6ウェル分を一つ

にまとめてG 4 1 8 ( 6 0 0  $\mu$  g / m l ) を含む選択培地 ( 1 0 % F B S を添加したD M E M ) に懸濁し、4 8 穴組織培養用プラスチックシャーレ ( フアルコン ) 5 枚に播種した。2 ~ 3 週間後には耐性コロニーが出現し、その頻度はA 9  $\Delta$  1 2 細胞 5  $\times$  1 0 <sup>6</sup> あたり 4 個であった。コロニーを単離してさらに培養した結果、5 1 個のコロニーが増殖した。上記の得られた細胞を以後A 9  $\Delta$  E T 1 細胞と称する。

## ( 2 ) 移入染色体の確認

### ( 2 - 1 ) P C R 解析

10 A 9  $\Delta$  E T 1 細胞について解析した。1 0 x P サイト近傍に位置するヒト 2 1 番染色体長腕近位のマーカーP R E D 6 5 及びP R E D 3 遺伝子 ( 実施例 1 の ( 3 ) 、図 2 参照 ) についてP C R 増幅を行った。1 0 x P 配列間の部位特異的組換え反応によるヒトE P O 遺伝子挿入体は、P R E D 6 5 及びP R E D 3 遺伝子を保持することが予想される。その結果、予想された増幅が認められた。次に、15 ヒト 2 1 番染色体の短腕近位に位置するS T S マーカーD 2 1 S 2 7 5 につきP C R 増幅を行った ( 実施例 6 の ( 3 ) 、図 1 2 参照 ) 。ヒト 2 1 番染色体の短腕近位で短腕遠位を削除してあるので、D 2 1 S 2 7 5 マーカーを保持することが予測される。その結果、予想された増幅が確認された。

### ( 2 - 2 ) 薬剤選択培養

20 ヒト 2 1 番染色体由来H A C ベクター上に存在する薬剤耐性遺伝子、すなわちハイグロマイシン耐性遺伝子 ( 短腕遠位 ) 及びブラストサイジン耐性遺伝子が選択薬剤存在下で機能するかを指標として、各薬剤耐性遺伝子を含む領域が保持されているかを確認した。

25 A 9  $\Delta$  E T 1 細胞について、6 ウェル培養ディッシュ ( フアルコン ) 各ウェルにて細胞密度が 6 0 ~ 7 0 % 飽和程度までG 4 1 8 ( 6 0 0  $\mu$  g / m l ) を含む選択培地 ( 1 0 % F B S , D M E M ) で培養した。P B S ( ギブコB R L ) で 2 回リンスした後、ハイグロマイシン ( 7 0 0  $\mu$  g / m l 、ギブコB R L ) のみ、又はブラストサイジン ( 4  $\mu$  g / m l ) のみ、又はブラストサイジン及びハイグ

ロマイシン及びG 4 1 8を含む培養液で1週間培養した。その結果を表16に示す。

表16

クローン名	Brasticidin (Bsd)	Hygromycin (Hyg)
A9ΔET1	R	R

5

以上よりA 9 Δ E T 1細胞がブラストサイジン及びハイグロマイシン及びG 4 1 8耐性を有することを確認した。

#### (2-3) ヒトEPO遺伝子組換え挿入体の確認

- 10 組換え挿入体の選別は、ヒト21番染色体由来HACベクター上のloxP配列部位に挿入されたか否かを、loxP配列部位を挟むようにヒトEPO遺伝子供与ベクター由来配列上及びHACベクター上にプライマーを設計し、PCR増幅により確認した。

- 15 A 9 Δ E T 1細胞について、実施例9(4)に示したNeo Rp2プライマー(配列番号38)及びプラスミドベクターpBS226由来のM13RVプライマー(配列番号39)を用いてPCR増幅を行った。組換え挿入体の場合は、pLN1-EPOベクター由来のCMVプロモーター、ヒトEPO遺伝子、SV40ポリA付加配列を含む領域からloxP配列までとpSF1由来のloxP配列からneo遺伝子の一部までを含む約2.3kbpの増幅が予想される。その結果、  
20 予想される増幅が確認された。

以上より、上記のA 9 Δ E T 1細胞は、CMVプロモーター及びヒトEPO遺伝子及びSV40ポリA付加配列を含むインサートDNAをコピー挿入されたヒト21番染色体由来HACベクターを保持することが確認された。

- 25 以上の(2-1)から(2-3)の実験より、A 9 Δ E T 1細胞が、長腕及び短腕を削除したヒト21番染色体由来HACベクターを保持することが確かめら

れた。

〔実施例 17〕 短腕を削除したヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターのハムスター細胞株への移入

5 (1) 微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として実施例 6 で得られた、長腕遠位を削除して 10xP 配列を挿入し、短腕遠位を削除したヒト 21 番染色体に基づく HAC ベクターを保持する DT40 細胞 (DT40 (#21) hyg4) を用いた。染色体受容細胞として、チャイニーズハムスター由来細胞株 CHO-K1 (ATCC より入手、  
10 登録番号 JCRB9018) を用いた。マイクロセルの取得及び CHO 細胞との融合は実施例 3 (1) と同様に行った。計 4 回の融合を行った結果、選択培養開始後約 2 週間後に計 5 株のハイグロマイシン耐性 CHO 株を得た。

(2) 移入染色体の確認

15 (2-1) PCR 法

移入染色体の確認を PCR 法により行った。ヒト 21 番染色体短腕近位のマーカ pCHB、D21S187 及び D21S275 (実施例 6 の (3-1)、図 12 参照) の検出を試みた。ハイグロマイシン耐性の CHO 細胞 5 株のうち 2 株 (CHO #21 hyg4 及び CHO #21 hyg8) において、切断点より近位  
20 に位置する D21S275 の増幅を確認した。

(2-2) PCR 法

組換えの標的部位を挟んだ配列を PCR により増幅した (実施例 6 の (3-3)、図 12 参照)。CHO #21 hyg4、8 の 2 株でのみ増幅産物が得られ、制限  
25 酵素 NsiI 消化でも予想される部分断片の生成を確認した。

(2-3) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH)

FISH 解析は、松原ら (FISH 実験プロトコール, 秀潤社, 1994) に記さ

れた方法に従い、ヒト特異的プローブC o t 1 (ギブコB R L)を用いて行った。ハイグロマイシン耐性のC H O株のうちの2株 (C H O # 2 1 h y g 4及びC H O # 2 1 h y g 8) について解析したところ、いずれも観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト21番染色体が検出された。宿主であるC H O細胞の染  
5 色体との相対的な大きさから、短縮したヒト21番染色体がC H O細胞に移入されたことが確認された。

以上の(1)及び(2)の実験から、得られたハイグロマイシン耐性C H O株は長腕遠位を削除しl o x P配列を挿入し、短腕遠位を削除したヒト21番染色体部分断片(H A Cベクター)を保持することが確かめられた。  
10

〔実施例18〕短腕遠位を削除したヒト21番染色体由来H A Cベクターのヒト細胞株への移入及び安定性の確認

(1) 微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

15 染色体供与細胞として、実施例17で得られた、長腕遠位を削除してl o x P配列を挿入し短腕遠位を削除したヒト21番染色体に基づくH A Cベクターを保持するC H O細胞(C H O (# 2 1) h y g 4及びC H O (# 2 1) h y g 8)を用いた。染色体受容細胞としてはヒト線維肉腫細胞株H T 1 0 8 0 (A T C Cより入手、登録番号C C L - 1 2 1)を用いた。ミクロセルの取得及びH T 1 0  
20 8 0細胞との融合は実施例4(1)と同様に行った。C H O (# 2 1) h y g 4では1回の微小核細胞融合から計7のプラストサイジン耐性H T 1 0 8 0株、C H O (# 2 1) h y g 8では2回の微小核細胞融合から計20のプラストサイジン耐性H T 1 0 8 0株を得た。

25 (2) 移入染色体の確認

(2-1) P C R法

移入染色体は、プラストサイジン耐性遺伝子(実施例4(2-1)参照)及びハイグロマイシン耐性遺伝子のP C R増幅により確認した。用いたオリゴヌクレ

オチドプライマーの配列を次に示す：

HygroF : 5' - GCGAAGAATCTCGTGCTTTC (配列番号 5 5)

HygroR : 5' - ATAGGTCAGGCTCTCGCTGA (配列番号 5 6)

5 プラストサイジン耐性遺伝子は、プラストサイジン耐性HT1080株のすべてにおいて増幅が確認された。一方ハイグロマイシン耐性遺伝子は、CHO (#21) hyg4由来の7株中5株、CHO (#21) hyg8由来の30株中27株において増幅が確認された。

## (2-2) 染色体解析

10 染色体解析は、松原ら (FISH実験プロトコール, 秀潤社, 1994) に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1 (ギブコBRL) を用いたFISH法により行った。代表的なFISH像を図17に示す。プラストサイジン耐性株では、親株のHT1080細胞には存在せず、内在の21番染色体よりサイズの小さい染色体断片が観察された。

15

以上の(1)及び(2)の実験から、得られたプラストサイジン耐性HT1080株は長腕遠位を削除しloxP配列を挿入し、短腕遠位を削除したヒト21番染色体部分断片(HACベクター)を保持することが確かめられた。

## 20 (3) 非選択培養条件下での長期継代培養

長腕遠位を削除したヒト21番染色体と、さらに短腕遠位を削除したヒト21番染色体の培養細胞における安定性を確認するために、非選択条件下で長期継代培養を行った。実施例4に記載したヒト細胞株 (HT1080 (#21) bsd79-1-1, 3, 6, 11, 14、HT1080 (#21) bsd-H4-1, 3, 6、HT1080 (#21) bsd-H8-4, 9, 2) を使用した。ヒト細胞株用の非選択培養液は10%CSを加えたDMEMであり、選択培養液はこれにプラストサイジン4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を添加した。ヒト細胞株は $5.0 \times 10^5$ 細胞を10cm径ディッシュに播種し、3日後に細胞を計数して再び $5.0 \times 10$

<sup>5</sup>細胞を10cm径ディッシュに播種した。ヒト細胞株は集団倍加数25, 50, 100にそれぞれ細胞を回収し染色体標本を作製した。

#### (4) 染色体解析

- 5 ヒト細胞における人工染色体の検出は、黒木ら（細胞工学ハンドブック，羊土社，1992）に記された方法に従いギムザ染色法により行った。分裂中期染色体像20個においてミニ染色体の有無を観察して保持率を算出し、5クローンの平均値を出した。その結果を表17に示す。

10 表17: #21HACのHT1080細胞における安定性

HAC	細胞集団 倍加数	HAC保持率(%)	
		薬剤選択なし	薬剤選択あり
#21 Δ qHAC	50	98	99
	100	95	97
#21 Δ pqHAC	25	76	79
	50	85	88
	100	83	79

ヒト21番染色体部分断片は、HT1080細胞において分裂回数100回時点で安定に保持されていた。また分裂中期の染色体像を観察したところ、細胞あたり1ないし2本の部分染色体が認められた。

15

以上の(3)及び(4)の実験により、ヒト21番染色体の長腕遠位を削除した部分断片と、さらに短腕遠位を削除した部分断片はHT1080細胞株において非選択培養条件で安定に保持されること、また細胞あたりのコピー数は維持されていることが明らかとなった。

20

〔実施例19〕 ヒト細胞株におけるヒト21番染色体由来HACベクターへのGFP遺伝子挿入

(1) トランスフェクション及びG418耐性クローンの単離



実施例 18 で作製したヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターを保持するヒト HT1080 細胞株 (HT1080 (#21) bsd79-1-6, 14, HT1080 (#21) bsd-H4-1, 6, HT1080 (#21) bsd-H8-2) をトリプシン処理し、6 ウェルクラスター (ヌンク) の 1 ウェルあたり  $4 \times 10^5$  細胞を播種し 1 日間培養した。実施例 5 (1) で作製した loxP 配列を含む GFP 発現プラスミド 2  $\mu$ g と Cre 酵素発現ベクター pBS185 (ライフテック) 1  $\mu$ g を 7.5  $\mu$ l のリポソーム溶液 (リポフェクトアミン 2000、インビトロジェン) と混合して培地に添加し 5 時間後に培地を交換した。1 日培養後トリプシン処理し、10% CS を添加した DMEM 培地に懸濁して 100 mm ディッシュ 2 枚に播種した。翌日 400  $\mu$ g/ml の G418 (GENETICIN、シグマ) を含む培地と置き換えた。約 2 週間後には耐性コロニーが出現し、その頻度は HT1080 細胞  $4 \times 10^5$  あたり 3 ~ 14 個であった。コロニーを単離して増殖させ、以後の解析を行った。

(2) ヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターに挿入された GFP 遺伝子の発現  
単離した G418 耐性 HT1080 細胞株を蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、21  $\Delta$ q HAC では 21 クローン中 14 クローンにおいて、また 21  $\Delta$ p q HAC では 31 クローン中 28 クローンにおいて GFP の発現が確認された。代表的な蛍光顕微鏡像と可視顕微鏡像を図 18 a 及び b に示す。

### (3) 相同組換え体の確認

相同組換え体を確認するため、組換えの標的部位を挟んだ配列を PCR により増幅した。pBS226 及び pSF1 プラスミド上に設定したプライマーオリゴヌクレオチドの配列を以下に示す。

CMVneo689:5' - GCCATCCACGCTGTTTTGAC (配列番号 57)

CMVneo910:5' - GCATCAGAGCAGCCGATTGT (配列番号 58)

GFP 遺伝子の発現によらず全ての G418 耐性クローンで PCR 増幅が認め

られ、相同組換え体であることを確認した。

以上（１）～（３）の実験より、ヒト２１番染色体由来HACベクターにはヒト細胞株中においても遺伝子の挿入が可能であり、挿入された遺伝子が発現することが確かめられた。

#### （４）長期継代培養後のGFP遺伝子の発現

G418耐性HT1080細胞株から任意の７株を選び、選択薬剤非添加の条件で継代培養した。培養開始から１ヶ月後（集団倍加数約３０）に蛍光顕微鏡下で観察した結果、いずれのクローンにおいてもGFP遺伝子の発現が確認された。

以上の実験（４）より、ヒト２１番染色体由来HACベクターに挿入された遺伝子は挿入部位の位置効果を受けて発現が減弱することなく安定に発現を維持すること、すなわちHACベクター上の遺伝子挿入サイトはヘテロクロマチン領域でないことが確かめられた。

〔実施例２０〕ヒト２１番染色体由来HACベクターのマウスES細胞株への移入及び安定性の確認

#### （１）微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として、実施例５で得られた長腕遠位を削除してloxP配列を導入したヒト２１番染色体由来HACベクターにGFP遺伝子を挿入したCHO細胞株（CHO（＃２１）ΔqGFP7-2）と、実施例１７で得られた長腕遠位を削除してloxP配列を導入し短腕遠位を削除したヒト２１番染色体由来HACベクターを保持するCHO細胞（CHO（＃２１）Hyg8）を用いた。受容細胞としてはマウスES細胞株E14（Hooperら、Nature、326:292、1987）を用いた。E14の培養方法は（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ８、ジーンターゲットティング、羊土社、1995）に記された方法に従い、栄養細胞としてはマイトマイシンC処理したマウス胚初代培養細胞（インビトロジェン）を用いた。まず約 $10^8$ 個の供与細胞からマイクロセルを調製し全量5mlのDMEM

に懸濁した。約  $10^7$  個の E14 を DMEM で 3 回洗浄し、5 ml の DMEM に懸濁した後、マイクロセルとあわせ、1250 rpm、10 分間遠心して上清を除いた。沈殿をタッピングによりよくほぐし、1:1.4 PEG 溶液 (5 g PEG 1000 (和光純薬)、1 ml DMSO (シグマ)) を 6 ml DMEM に溶解) 0.5 ml を加えて室温で 1 分 30 秒静置した後、10 ml の DMEM をゆっくりと加えた。直ちに 1250 rpm、10 分間遠心して上清を除き、沈殿を 30 ml の ES 細胞用培地に懸濁し、直径 100 mm の組織培養用プラスチックシャーレ (ファルコン) 3 枚に播種した。24 時間後に CHO (#21)  $\Delta$ qGFP 7-2 を供与細胞とする場合 300  $\mu$ g/ml の G418 (GENETICIN、シグマ)、

10 CHO (#21) Hyg8 を供与細胞とする場合 150  $\mu$ g/ml のハイグロマイシン (Hygromycin-B、和光純薬) 加えた培地と交換し、その後毎日培地を交換した。1 週間～10 日後には耐性コロニーが出現したが、その頻度は E14 細胞  $10^7$  個あたり 2～5 個であった。そのコロニーを単離し増殖させ、 $5 \times 10^7$  個あたり 1 ml の保存用培地 (ES 細胞用培地 + 10% DMSO (シグマ)) に懸濁し、 $-80^\circ\text{C}$  にて凍結保存した。同時に各耐性株について約  $10^6$  個の細胞からゲノム DNA を調製した (Puregene DNA Isolation Kit (Gentra System 社))。

15

## 20 (2) PCR 解析

移入染色体と保持領域は PCR 増幅により確認した。以下に示すプライマーオリゴヌクレオチドを新たに設定した：

#21p76957 : 5' - ACACTTTTGACAAACACACCAG (配列番号 59)

#21p77555 : 5' - TCAACAATGAAAGGGGATGTC (配列番号 60)

25 これらのプライマーは、GenBank より入手した塩基配列 (アクセッション番号 AL163201) を基に作製した。解析に用いたオリゴヌクレオチドプライマーを下記表 18 に示す：

表18

マーカー名	オリゴヌクレオチド	配列番号	参照する実施例
pCHB			6(3-1)
D21S187			6(3-1)
	#21p76957/ #21p77555	39/40	本実施例
	HygroF/ HygroR	35/36	18(2-1)
	Hyg968/ #21p96705	27/28	6(3-3)
	#21p91203/ #21p91976	25/26	6(3-2)
	Spe31203/ Bam36192	23/24	6(1)
D21S275			6(3-1)
	PRED65F/ PRED65R	3/4	1(3-1)
	PRED3F/ PRED3R	5/6	1(3-1)
	#21qEcoF/#21qEcoR	9/10	2(1)
	Left455F/ Left638R	15/16	2(3-2)
	Right958F/ Right1152R	17/18	2(3-2)
	#21qBaF/#21qBaR	11/12	2(1)

以上の結果を図19に示す。得られた薬剤耐性株では、いずれも移入した染色体領域の一部が欠失していた。

5

### (3) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 解析

FISH解析は、松原ら (FISH実験プロトコール, 秀潤社, 1994) に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1 (ギブコBRL) を用いて行った。その結果、観察した分裂像のほとんどにおいて短縮したヒト21番染色体が検出された。代表的なFISH像を図20a及びbに示す。CHO (#21) ΔqGFP7-2由来G418耐性株では5株中1株 (E14 (#21) neo1) でヒト染色体断片が観察された。CHO (#21) Hyg8由来ハイグロマイシン耐性の2株では、いずれもヒト染色体断片が観察された。このうちE14 (#21) Hyg1では2本のヒト染色体断片が、E14 (#21) Hyg2では1本のヒト染色体断片が観察された。ヒト染色体の確認された上記3株では、宿主であるマウスの染色体数はいずれも40本で正常であることを確認した。

10

15

以上の(2)及び(3)の結果から、得られたG418耐性ないしハイグロマ

イシン耐性E 1 4株はヒト21番染色体由来HACベクターを保持することが確かめられた。

#### (4) 非選択培養条件下での長期継代培養

- 5 ヒト21番染色体由来HACベクターのマウスES細胞における安定性を確認するために、非選択条件下で選択培養を行った。上記(3)で作製したマウスES細胞株E 1 4 (#21) neo1、E 1 4 (#21) Hyg1、E 1 4 (#21) Hyg2を使用した。マウスES細胞用の非選択培養液は18.2% FBS (インビトロジェン)、3.5 g/l グルコース (シグマ)、0.125 mM M  
10 EM非必須アミノ酸 (インビトロジェン)、1000 U/ml LIF (ESGRO、和光純薬)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール (シグマ) を加えたDMEMである。マウスES細胞株は $1 \times 10^7$ 細胞を10 cm径ディッシュ中の栄養細胞上に播種し、2日後に1/15を10 cm径ディッシュ中の栄養細胞上に播種した。培養開始から14, 28, 42日後にそれぞれ細胞を回収し、  
15 染色体標本作製した。

#### (5) 染色体解析

- マウスES細胞におけるヒト21番染色体由来HACベクターの検出は松原ら (FISH実験プロトコール, 秀潤社, 1994) に記された方法に従い、ヒト特異  
20 的プローブCot1 (ギブコBRL) を用いたFISH解析法により行った。20個の分裂中期像においてヒト染色体断片の有無を観察し、保持率を算出した。その結果を表19に示す。長期継代培養は各株とも3連で行い、保持率としての平均を示した。

表19

細胞株	細胞集団倍加数 (積算)	HAC保持率% (2コピー／1コピー)
E14(#21)neol	0	80(0／80)
	25	57(0／57)
	50	51(0／51)
	75	48(0／48)
E14(#21)Hyg1	0	98(73／25)
	25	95(60／35)
	50	92(57／35)
	75	89
E14(#21)Hyg2	0	98(0／98)
	25	96(0／96)
	50	92(0／92)
	75	89(0／89)

ヒト21番染色体から長腕遠位を削除した部分断片は、非選択条件下での長期継代培養に伴って減少する傾向を示した。これに対してヒト21番染色体から長腕遠位、短腕遠位をともに削除した部分断片は、分裂回数75回を超えても減少することなく安定に保持されていた。また長期継代培養開始時点で細胞あたりの染色体断片のコピー数が1であった株では、コピー数の増加はみられなかった。長期継代培養開始時点で細胞あたりの染色体断片のコピー数2が優性であった株では、僅かながらコピー数が減少する傾向がみられた。

10

以上の(4)及び(5)の実験により、ヒト21番染色体の長腕遠位及び短腕遠位を削除した部分断片はマウスES細胞株において非選択培養条件下で安定に保持されること、また細胞あたりのコピー数は維持されていることが明らかとなった。

15

〔実施例21〕ヒト21番染色体由来HACベクターのヒト体幹細胞株への移入及び安定性

(1) 微小核細胞融合と薬剤耐性クローンの単離

染色体供与細胞として、実施例17で得られた、長腕遠位を削除して10xP

配列を挿入し短腕遠位を削除したヒト 21 番染色体に基づく HAC ベクターを保持する CHO 細胞 (CHO (#21) hyg4 及び CHO (#21) hyg8) を用いた。染色体受容細胞としてはヒト hTERT 遺伝子及びヒトパピローマウイルス E6/E7 遺伝子により株化したヒト骨髓由来間葉系幹細胞株 hiMSC (京都大学、戸口田淳也教授より入手、Okamoto ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 295: 354, 2002) を用いた。hiMSC 株は、10% FBS を添加した DMEM 培地を用いて培養した。はじめに約  $10^7$  個の CHO (#21) hyg4/8 細胞からマイクロセルを調製した。すなわち、 $25\text{ cm}^2$  遠心用フラスコ (コースター) 6 本に細胞密度が 60~70% 飽和程度まで培養した CHO (#21) hyg4/8 細胞をコルセミド ( $0.075\text{ }\mu\text{g/ml}$ , デメコルシン, 和光純薬) を含む培養液 (10% FBS,  $8\text{ }\mu\text{g/ml}$  プラストサイジン, F12) 中で 48 時間培養して微小核を誘導した。培地を除いた後、予め保温 ( $37^\circ\text{C}$ ) しておいたサイトカラシン B (DMEM 中に  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ , シグマ) 溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、 $34^\circ\text{C}$ , 8,000 rpm, 1 時間の遠心を行った。マイクロセルを無血清培地 (DMEM) に懸濁して回収し、フィルターで濾過して精製した。6 cm 径ディッシュに 80% 飽和の状態まで培養した hiMSC 細胞に、精製した微小核細胞を加え PEG 溶液で融合した。48 時間後にトリプシン処理により細胞を分散し、プラストサイジン ( $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) を含む選択培地 (10% CS, DMEM) で培養した。約 2 週間の選択培養の後、出現した薬剤耐性のコロニーを単離し、以後の解析を行った。CHO (#21) hyg4 では 1 クローン、CHO (#21) hyg8 では 4 クローンのプラストサイジン耐性 hiMSC 株を得た。

## (2) 移入染色体の確認

### (2-1) PCR 法

移入染色体は、プラストサイジン耐性遺伝子 (実施例 4 (2-1) 参照) 及びハイグロマイシン耐性遺伝子 (実施例 18 (2-1) 参照) の PCR 増幅により確認した。プラストサイジン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子ともに検

索した5株のプラストサイジン耐性HT1080株のすべてにおいて増幅が確認された。

## (2-2) 染色体解析

- 5 染色体解析は、松原ら (FISH実験プロトコール, 秀潤社, 1994) に記された方法に従い、ヒト特異的プローブCot1 (ギブコBRL) を用いたFISH法により行った。代表的なFISH像を図21に示す。プラストサイジン耐性株では、親株のhMSC細胞には存在せず、内在の21番染色体よりサイズの小さい染色体断片が観察された。

10

以上の(1)及び(2)の実験から、得られたプラストサイジン耐性hMSC株は長腕遠位を削除しloxP配列を挿入し、短腕遠位を削除したヒト21番染色体部分断片(HACベクター)を保持することが確かめられた。

## 15 (3) 非選択培養条件下での長期継代培養

- ヒト21番染色体由来HACベクターの、多分化能を持つヒト体幹細胞における安定性を確認するために、非選択条件下で長期継代培養を行った。上記(1)及び(2)で作製したヒト間葉系幹細胞株(hMSC(#21)bsd-H4-1、hMSC(#21)bsd-H8-1, 2, 3, 4)を使用した。ヒト
- 20 細胞株用の非選択培養液は10%FBSを加えたDMEMであり、選択培養液はこれにプラストサイジン4 $\mu$ g/mlを添加した。ヒト細胞株は $5.0 \times 10^5$ 細胞を10cm径ディッシュに播種し、3日後に細胞を計数して再び $5.0 \times 10^5$ 細胞を10cm径ディッシュに播種した。ヒト細胞株は培養開始時点から集団倍加数15, 40, 90にそれぞれ細胞を回収し染色体標本を作製した。

25

## (4) 染色体解析

ヒト間葉系幹細胞におけるヒト21番染色体由来HACベクターの検出は、松原ら (FISH実験プロトコール, 秀潤社, 1994) に記された方法に従い、ヒト



21番染色体由来アルフォイド特異的プローブp11-4（名古屋大学、舩本寛教授より入手、Ikenoら、Hum. Mol. Genet., 3: 1245, 1994）を用いたFISH法により行った。分裂中期染色体像50個においてミニ染色体上の蛍光シグナルの有無を観察して保持率を算出した。その結果を表20に示す。

5

表20: #21HACのhiMSC細胞における安定性

	細胞株	薬剤選択	保持率%			
			0PDL	15PDL	40PDL	90PDL
10	HiMSC(#21)-H4-1	+	96	92	94	88
		—		82	77	65
	HiMSC(#21)-H8-1	+	100	98	98	95
		—		75	73	84
15	HiMSC(#21)-H8-2	+	87	82	82	80
		—		80	77	80
	HiMSC(#21)-H8-3	+	100	89	94	90
		—		87	88	80
	HiMSC(#21)-H8-4	+	89	87	88	90
		—		75	77	80

20 ヒト21番染色体部分断片は、hiMSC細胞において分裂回数90の時点で安定に保持されていた。また分裂中期の染色体像を観察したところ、細胞あたり1コピーの部分染色体断片が認められた。

25 以上の（3）及び（4）の実験により、ヒト21番染色体由来HACベクターはhiMSC細胞株において非選択培養条件で安定に保持されること、また細胞あたりのコピー数は維持されていることが明らかとなった。

〔実施例22〕ヒト21番染色体由来HACベクターを移入したヒト体幹細胞株のインビトロ分化誘導による多分化能の確認

30 実施例21で作製したヒト21番由来HACベクターを移入したヒト間葉系幹細胞をOkamotoら（Biochem. Biophys. Res. Commun., 295: 354, 2002）の方法に従って分化誘導し、骨、軟骨、脂肪細胞への分化能を調べた。実施例21に記

載したヒト間葉系幹細胞株 (h i M S C (# 2 1) b s d - H 8 - 1) 及びその親株 (h i M S C) を使用した。

(1) 骨細胞への分化誘導

- 5 h i M S C細胞を、 $3 \times 10^3 / \text{cm}^2$ の密度で播種し、10% F B Sを含むD M E M培地に100 n Mデキサメタゾン (シグマ)、50  $\mu$  Mアスコルビン酸2リン酸 (シグマ)、10 m M  $\beta$  グリセロリン酸 (シグマ) を添加した培地中で21日間培養した。この間培地は2日毎に交換した。

10 (2) 軟骨細胞への分化誘導

2.  $5 \times 10^5$ のh i M S C細胞を15 m l容のポリプロピレンチューブ (コーニング) に回収し室温で800 r p m 5分間遠心した。細胞沈殿を、高グルコースD M E Mに10 n g / m l ヒトT G F -  $\beta$  3 (インビトロジェン)、100 n Mデキサメタゾン (シグマ)、6  $\mu$  g / m l インスリン (ロシュ)、100  $\mu$  Mアスコルビン酸2リン酸 (シグマ)、1 m Mピルビン酸ナトリウム (シグマ)、6  $\mu$  g / m l トランスフェリン (シグマ)、0.35 m Mプロリン (シグマ)、1.25 m g / m l ウシ血清アルブミン (インビトロジェン) を添加した培地に再懸濁して遠心したのち、細胞塊の状態です21日間培養した。この間培地は2日毎に交換した。

20

(3) 脂肪細胞への分化誘導

- h i M S C細胞を培養ディッシュに $3 \times 10^3 / \text{cm}^2$ の密度で播種し、コンフルエントまで培養したのち、誘導/維持培養を3回繰り返した。誘導培養は10% F B Sを含むD M E Mに1  $\mu$  Mデキサメタゾン (シグマ)、0.2 m Mインドメタシン (シグマ)、10  $\mu$  g / m l インスリン (シグマ)、0.5 m M 3-イソブチルー1-メチルキサンチン (シグマ) を添加した誘導培地で3日間行った。維持培養は10% F B Sを含むD M E Mに10  $\mu$  g / m l インスリン (ロシュ) を添加した維持培地で2日間行った。

#### (4) 組織染色

2 1 日間の培養後、細胞はPBSで2度洗ったのち10%ホルマリンで固定した。骨細胞分化では5%硝酸銀（ナカライ）、脂肪細胞分化では0.3%オイル  
5 レッドO（ナカライ）、により染色した。軟骨細胞分化では固定した細胞塊をエタノールにより脱水しキシレンで洗浄したのちパラフィン包埋し、切片をアルシアンブルー（ナカライ）により染色した。

ヒト21番染色体由来HACベクターを移入した間葉系幹細胞株hiMSC  
（#21）bsd-H8-1を分化誘導すると、親株のhiMSCと同様、骨、  
10 軟骨、脂肪細胞に特異的な組織染色に対し陽性であった。

以上の（1）～（4）の実験結果から、ヒト21番染色体由来HACベクターを移入した間葉系幹細胞は、骨、軟骨、脂肪細胞への多分化能を維持していることが確かめられた。

15

〔実施例23〕カニクイザルES細胞へのマイクロセル法によるヒト14番染色体断片導入

染色体供与細胞としてはヒト14番染色体断片SC20（Tomizuka ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 722-727, 2000）を保持するマウスA9細胞株（以下  
20 A9/SC20、という）を用いた。染色体受容細胞としてはカニクイザルES細胞株CMK6.4（Suemori ら、Dev. Dyn. 222, 273-279, 2001）を用いた。CMK6.4の培養は、Suemori ら（前記）に記載された方法に従って実施した。培地の組成は、DMEM/F12（SIGMA D-6421）に、20%KSR（Knock out serum replacement, GIBCO BRL）、非必須アミノ酸溶液（×  
25 100, SIGMA M7145）、及びLグルタミン溶液（×100, SIGMA M7522）を添加したものである。まず、清水ら（細胞工学ハンドブック、羊土社、1992）の報告した方法に従い、25cm<sup>2</sup>フラスコ（Nunc 152094）24本（70～80%コンフルーエント）のA9/SC20細胞

からマイクロセルを調製した。得られたマイクロセルは全量を 5 ml の DMEM (SIGMA D-5796) に懸濁した。1~5×10<sup>6</sup>個の CMK6.4 細胞をトリプシン液 (0.25%トリプシン、20%KSR) で分散させた後、DMEM で 2 回洗浄し、5 ml の DMEM に懸濁した後、マイクロセルとあわせ、1500 rpm、7 分間遠心して上清を除いた。融合に用いる 1:1.4 PEG 溶液は、1 g の PEG (SIGMA) を 1.2 ml の DMEM に溶解し、0.2 ml DMSO (SIGMA) を添加することにより調製した。沈殿をタッピングによりよくほぐし、37℃でプレインキュベートした 1:1.4 PEG 溶液 1.0 ml を加えて室温で 2 分間静置した後、10 ml の DMEM をゆっくり加えた。直ちに 1500 rpm、7 分間遠心して上清を除き、沈殿を 4 ml の ES 細胞用培地に懸濁し、あらかじめ G418 耐性栄養細胞をまいた直径 35 mm の組織培養用プラスチックシャーレ 2 枚に播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37℃、5%CO<sub>2</sub>) で培養した。24 時間後、50 μg/ml の G418 を加えた培地と交換し、その後毎日培地交換を行った。1 週間から 10 日後には薬剤耐性コロニーが出現した。ピックアップされた薬剤耐性 ES 細胞コロニーをあらかじめ G418 耐性栄養細胞をまいた 4 ウェルプレートに播種し、50 μg/ml の G418 存在下でさらに 10 日間培養を行った。その結果生き残った ES 細胞コロニーを再度ピックアップして、あらかじめ栄養細胞をまいた 4 ウェルプレートに播種し、非選択条件下でさらに 10 日間培養を行った。増殖した ES 細胞は、アルカリ性フォスファターゼ染色 (Suemori ら、前記) 陽性であり、未分化能を維持していることが示された。さらに定法に従って抽出されたゲノム DNA を用いた導入染色体保持確認は以下の通り実施した。

薬剤耐性株ゲノム DNA を鋳型としてヒト 14 番染色体断片に含まれる Neo 遺伝子 (pSTneoB, Tomizuka ら, Nature Genet. 16, 133-143, 1997) の存在を PCR 法により検出した。以下に使用したプライマーオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。反応条件は、約 0.1 μg のゲノム DNA を鋳型とし、Taq ポリメラーゼとしてはタカラ ExTaq を用い、94℃5 分の反応を 1 サイクル行った後、94℃15 秒、59℃15 秒及び 72℃20 秒を 35 サイクル行っ

た。

neoF : TGAATGAACTGCAGGACGAG (配列番号 6 1)

neoR : ATACTTTCTCGGCAGGAGCA (配列番号 6 2)

5 得られた G 4 1 8 耐性サル E S 細胞クローン 1 種について、P C R 解析を行った結果、N e o 遺伝子 (p S T n e o B) の存在を示す、特異的な増幅産物が検出された。これらの実験により、ミクロセル法によるヒト 1 4 番染色体断片 S C 2 0 のカニクイザル E S 細胞株への移入が示された。また、カニクイザル、アカゲザル、及びヒトを含む霊長類 E S 細胞はその性質が非常に似ていることが知ら

10 れている (末盛ら、実験医学、Vol. 21、No. 8、p 4 6 - 5 1、2 0 0 3、羊土社)。よってこの結果は、薬剤耐性マーキングされたヒト染色体 (断片) 及びヒト人工染色体 (H A C) を本実施例に記載の方法により、カニクイザル E S 細胞を含む霊長類 E S 細胞に移入可能であることを示している。

15 [実施例 2 4] ヒト 2 1 番染色体由来 H A C ベクターを移入したマウス E S 細胞株のインビトロ分化誘導による分化能の確認

実施例 2 0 で作製した、G F P 遺伝子を挿入したヒト 2 1 番染色体 H A C ベクターを保持するマウス E S 細胞を神経分化誘導し、神経細胞への分化能を調べた。マウス E S 細胞は、実施例 2 0 に記載したマウス E S 細胞株 E 1 4 (# 2 1) n

20 e o 1 を使用した。

(1) G F P 発現細胞の分取

E 1 4 (# 2 1) n e o 1 細胞は、直径 1 0 0 mm の組織培養用プラスチックシャーレ中の、マイトマイシン C 処理したマウス胚初代培養細胞 (インビトロジェン) 上に播種し、2 0 % F B S を含む D M E M (インビトロジェン) に 2 mM

25 L - グルタミン酸 (インビトロジェン)、0, 2 mM 2 - メルカプトエタノール (シグマ)、1 mM ビルビン酸ナトリウム (インビトロジェン)、0. 1 mM M E M 非必須アミノ酸、1 0 0 0 U / m l L I F (和光純薬) を添加した培地で培養した。0. 1 % トリプシン、0. 0 4 % E D T A 処理により分散した細胞

を培地中に回収してPBSで2回洗った後、 $1 \times 10^6$ 個/mlになるようPBSに懸濁してセルソーター（EPICS ELITE、ベックマン・コールター）にかけ、GFP発現細胞を分取した。

## 5 (2) 神経細胞への分化誘導

分化誘導用の栄養細胞であるマウス骨髄由来PA6細胞は、10%FBSを含む $\alpha$ MEM（インビトロジェン）に2mM L-グルタミン酸（インビトロジェン）を添加した培地で培養した。上記（1）で分取したGFP発現ES細胞 $1 \times 10^3$ 個を、血清及びLIFを含まない分化誘導用培地に懸濁してスライドチャンパー（ヌンク）中のPA6細胞上に播種した。分化誘導用培地は10%ノックアウト血清リプレースメント（インビトロジェン）を含むG-MEM（インビトロジェン）に2mM L-グルタミン酸（インビトロジェン）、0, 2mM 2-メルカプトエタノール（シグマ）、1mMピルビン酸ナトリウム（インビトロジェン）、0.1mM MEM非必須アミノ酸を添加したものである。10日間培養した後4%パラホルムアルデヒドで固定し、神経細胞で特異的に発現する $\beta$ チューブリンに対する抗体（TUJ1、Berkeley Antibody Company）により免疫染色し共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。突起を伸長し神経細胞の形態を呈し、抗 $\beta$ チューブリン抗体で染色される細胞においてGFPの発現が確認された。代表的な共焦点蛍光顕微鏡像を図22a及びbに示す。

20

以上（1）～（2）の実験より、ヒト21番染色体由来HACベクターを移入したES細胞は、神経細胞への分化能を維持していることが確かめられた。

### 産業上の利用可能性

25

本発明により、ヒト人工染色体（HAC）ベクターが提供される。本HACベクターは、その全体のサイズが縮小化されかつ不必要な遺伝子が削除されているため細胞中で安定に保持される。また本HACベクターは、ヒト染色体に基づいて作製されているため、大きなサイズの外来DNAを挿入することが可能である。

- また本HACベクターには、部位特異的組換え酵素の認識部位が挿入されているため、外来DNAをカセット形式で簡便に導入することができ、またその導入位置を適宜設定することができることから位置効果を受けることもない。さらに本HACベクターを用いることによって、大きなサイズの外来DNAを細胞に導入し、発現させることができる。従って、本HACベクターは、所望のタンパク質をコードする遺伝子の高発現による該タンパク質の生産、機能未知の遺伝子又はタンパク質の生体内機能解析、大きなサイズのDNAのクローニングのために使用することができ、遺伝子工学に関連する分野において有用である。
- 5

10 配列表フリーテキスト

配列番号 1 ～ 62 : 合成オリゴヌクレオチド

## 請 求 の 範 囲

1. 長腕遠位及び／又は短腕遠位が削除されたヒト 2 1 番染色体断片又はヒト 1 4 番染色体断片を含むことを特徴とするヒト人工染色体ベクター。
- 5 2. ヒト 2 1 番染色体断片又はヒト 1 4 番染色体断片が約 2 ～ 1 6 M b である、請求項 1 記載のヒト人工染色体ベクター。
3. ヒト 2 1 番染色体の長腕遠位が 2 1 q 1 1 領域内で削除されている、請求項 1 又は 2 記載のヒト人工染色体ベクター。
4. ヒト 2 1 番染色体の長腕遠位が A L 1 6 3 2 0 4 において削除されている、  
10 請求項 3 記載のヒト人工染色体ベクター。
5. ヒト 2 1 番染色体の短腕遠位が 2 1 p 領域内で削除されている、請求項 1 又は 2 記載のヒト人工染色体ベクター。
6. ヒト 2 1 番染色体の短腕遠位が A L 1 6 3 2 0 1 において削除されている、請求項 5 記載のヒト人工染色体ベクター。
- 15 7. ヒト 1 4 番染色体の長腕遠位が 1 4 q 領域内において削除されている、請求項 1 又は 2 記載のヒト人工染色体ベクター。
8. ヒト 1 4 番染色体の長腕遠位が A L 1 5 7 8 5 8 又は A L 5 1 2 3 1 0 において削除されている、請求項 7 記載のヒト人工染色体ベクター。
9. ヒト 1 4 番染色体の短腕遠位が 1 4 p 領域内において削除されている、請求  
20 項 1 又は 2 記載のヒト人工染色体ベクター。
- 1 0. ヒト 1 4 番染色体の短腕遠位が、O R 4 H 1 2、O R 4 Q 4、R N R 2、O R 4 L 1、R N U 6 C、F D P S L 3、K 1 2 T、C 1 4 o r f 5 7、O R 6 S 1、M 1 9 5、O R 4 K 1 4、M G C 2 7 1 6 5、L C H、O R 1 0 G 3、O R 4 K 3、O R 4 E 2、H 1 R N A、A T P 5 C 2、O R 1 1 H 6、及び O  
25 R 4 M 1 からなる群より選択される少なくとも 1 の位置において削除されている、請求項 9 記載のヒト人工染色体ベクター。
- 1 1. ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位が挿入されていることを特徴とする、請求項



1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のヒト人工染色体ベクター。

12. 部位特異的組換え酵素が Cre 酵素である、請求項 11 記載のヒト人工染色体ベクター。

13. 部位特異的組換え酵素の認識部位が loxP 配列である、請求項 11 又は 5 12 記載のヒト人工染色体ベクター。

14. 部位特異的組換え酵素の認識部位がヒト 21 番染色体の長腕近位の AL163203 に挿入されている、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のヒト人工染色体ベクター。

15 15. 部位特異的組換え酵素の認識部位がヒト 14 番染色体の長腕近位の AL157858 又は AL512310 の前記削除位置よりも近位に挿入されている、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のヒト人工染色体ベクター。

16. 部位特異的組換え酵素の認識部位がヒト 14 番染色体の短腕近位の 14p12 領域内の前記削除位置よりも近位に挿入されている、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のヒト人工染色体ベクター。

15 17. 長腕遠位及び／又は短腕遠位の削除が人工テロメア配列との置換によるものである、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のヒト人工染色体ベクター。

18. ヒト人工染色体ベクターの作製方法であって、以下のステップ：

(a) ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体を保持する細胞を得るステップ；

20 (b) 上記ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；並びに

(c) 上記ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；

を含む、上記作製方法。

25 19. ステップ (a) において、ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体を保持する細胞が相同組換え効率の高いものである、請求項 18 記載の作製方法。

20. 相同組換え効率の高い細胞がニワトリ DT40 細胞由来のものである、請求項 19 記載の作製方法。

21. ステップ (b) において、ヒト 21 番染色体又はヒト 14 番染色体の長腕

遠位及び／又は短腕遠位の削除を人工テロメア配列との置換により行うものである、請求項 18～20 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

22. ステップ (b) において、ヒト 21 番染色体の長腕遠位を AL 163204 において削除する、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

5 23. ステップ (b) において、ヒト 21 番染色体の短腕遠位を AL 163201 において削除する、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

24. ステップ (b) において、ヒト 14 番染色体の長腕遠位を AL 157858 又は AL 512310 において削除する、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

10 25. ステップ (b) において、ヒト 14 番染色体の短腕遠位を、OR4H12、OR4Q4、RNR2、OR4L1、RNU6C、FDPSL3、K12T、C14orf57、OR6S1、M195、OR4K14、MGC27165、LCH、OR10G3、OR4K3、OR4E2、H1RNA、ATP5C2、OR11H6、及び OR4M1 からなる群より選択される少なくとも 1 の位置  
15 において削除する、請求項 18～21 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

26. ステップ (c) において、部位特異的組換え酵素が Cre 酵素である、請求項 18～25 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

27. ステップ (c) において、部位特異的組換え酵素の認識部位が loxP 配列である、請求項 18～26 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

20 28. 部位特異的組換え酵素の認識部位をヒト 21 番染色体の長腕近位の AL 163203 に挿入する、請求項 18～27 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

29. 部位特異的組換え酵素の認識部位をヒト 14 番染色体の長腕近位の AL 157858 又は AL 512310 の前記削除位置よりも近位に挿入する、請求項 18～27 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

25 30. 部位特異的組換え酵素の認識部位をヒト 14 番染色体の短腕近位の 14p12 領域内の前記削除位置よりも近位に挿入する、請求項 18～27 のいずれか 1 項に記載の作製方法。

31. 請求項 18～30 のいずれか 1 項に記載の作製方法により得られる、ヒト

人工染色体ベクター。

3 2. 請求項 3 1 記載のヒト人工染色体ベクターを保持する細胞。

3 3. 請求項 1 8 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載された作製方法において、以下のステップ：

5 (d) 部位特異的組換え酵素の存在下にてヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体に外来 DNA を挿入するステップ；

をさらに含むことを特徴とする、外来 DNA を含むヒト人工染色体ベクターの作製方法。

10 3 4. 請求項 3 3 記載の作製方法により得られる、外来 DNA を含むヒト人工染色体ベクター。

3 5. 請求項 3 4 記載の外来 DNA を含むヒト人工染色体ベクターを保持する細胞。

3 6. 請求項 3 5 記載の細胞を含む医薬組成物。

3 7. 外来 DNA を受容細胞に導入する方法であって、以下のステップ：

15 (a) ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；

(b) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；

20 (c) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；

(d) 部位特異的組換え酵素の存在下にて上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体に外来 DNA を挿入するステップ；

(e) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体を保持する供与細胞からミクロセルを調製するステップ；

25 (f) 上記ミクロセルと受容細胞とを融合するステップ；並びに

(g) 融合した受容細胞において外来 DNA の導入を確認するステップ；を含む、上記導入方法。

3 8. 受容細胞が動物細胞である、請求項 3 7 記載の導入方法。

39. 動物細胞が哺乳動物細胞である、請求項38記載の導入方法。

40. 受容細胞が多分化能を有する細胞である、請求項37～39のいずれか1項に記載の導入方法。

41. 多分化能を有する細胞が胚性幹細胞（ES細胞）又は間葉系幹細胞若しくは組織幹／前駆細胞である、請求項40記載の導入方法。

42. 外来DNAを発現する細胞の作製方法であって、以下のステップ：

（a）ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞を得るステップ；

（b）上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；

（c）上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；

（d）部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体に外来DNAを挿入するステップ；

（e）上記ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞からミクロセルを調製するステップ；

（f）上記ミクロセルと受容細胞とを融合するステップ；並びに

（g）融合した受容細胞において外来DNAを発現する細胞を選択するステップ；

を含む、上記作製方法。

43. 受容細胞が動物細胞である、請求項42記載の導入方法。

44. 動物細胞が哺乳動物細胞である、請求項43記載の導入方法。

45. 受容細胞が多分化能を有する細胞である、請求項42～44のいずれか1項に記載の導入方法。

46. 多分化能を有する細胞が胚性幹細胞（ES細胞）又は間葉系幹細胞若しくは組織幹／前駆細胞である、請求項40記載の導入方法。

47. タンパク質の製造方法であって、以下のステップ：

（a）ヒト21番染色体又はヒト14番染色体を保持する供与細胞を得るステ

ップ；

(b) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕遠位及び／又は短腕遠位を削除するステップ；

5 (c) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体の長腕近位及び／又は短腕近位に部位特異的組換え酵素の認識部位を挿入するステップ；

(d) 部位特異的組換え酵素の発現下にて上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体にタンパク質をコードする外来 DNA を挿入するステップ；

(e) 上記ヒト 2 1 番染色体又はヒト 1 4 番染色体を保持する供与細胞からミクロセルを調製するステップ；

10 (f) 上記ミクロセルと受容細胞とを融合するステップ；

(g) 融合した受容細胞を培地中で培養するステップ；並びに

(h) 得られる培養物から上記タンパク質を採取するステップ；

を含む、上記製造方法。

4 8. タンパク質が、エリスロポイエチン (EPO)、トロンボポイエチン (TPO)、血液凝固因子、フォンウィルブランド因子 (vWF)、ジストロフィン、ドーパミン合成酵素、インスリン、インスリン様増殖因子 (IGF)、インスリン様増殖因子結合タンパク質 (IGFBP)、抗体、テロメラゼ、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子、免疫グロブリン、成長ホルモン、インターロイキン 2、インターロイキン 3、インターロイキン 4、インターロイキン 5、インターロイキン 6、インターロイキン 7、  
15 インターロイキン 8、インターロイキン 9、インターロイキン 10、インターロイキン 11、インターロイキン 12、インターロイキン 15、CD40 リガンド、インターフェロン、アデノシンデアミナーゼ、 $\alpha$ -1 アンチトリプシン、オルニチントランスカルバミラーゼ、プリンヌクレオチドホスホリラーゼ、成長抑制因子 (GIF)、腫瘍壊死因子 (TNF)、白血病阻害因子 (LIF)、  
20 オンコスタチン M、Flt3 リガンド (Flt3L)、ストローマ由来因子 (SDF)、幹細胞増殖因子 (SCF)、繊維芽細胞増殖因子 (FGF)、上皮増殖因子 (EGF)、血管形成誘導因子 (VEGF)、アンジオポイエチン、神

経成長因子（NGF）、骨形成因子（BMP）、アクチビン、トランスフォーミング増殖因子（TGF）、ウイント（Wnt）からなる群より選択されるものである、請求項４７記載の製造方法。

図 1

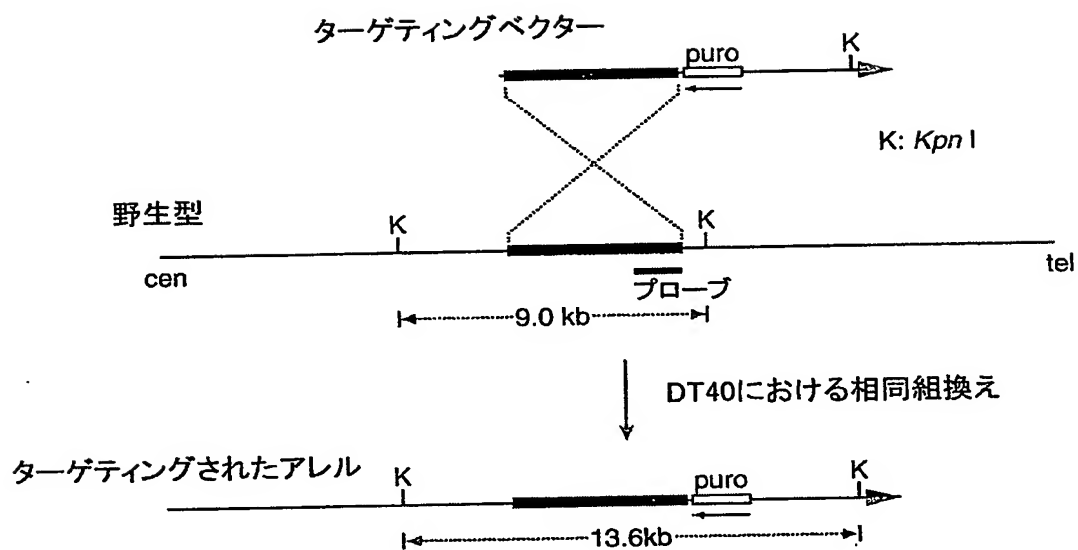


図2

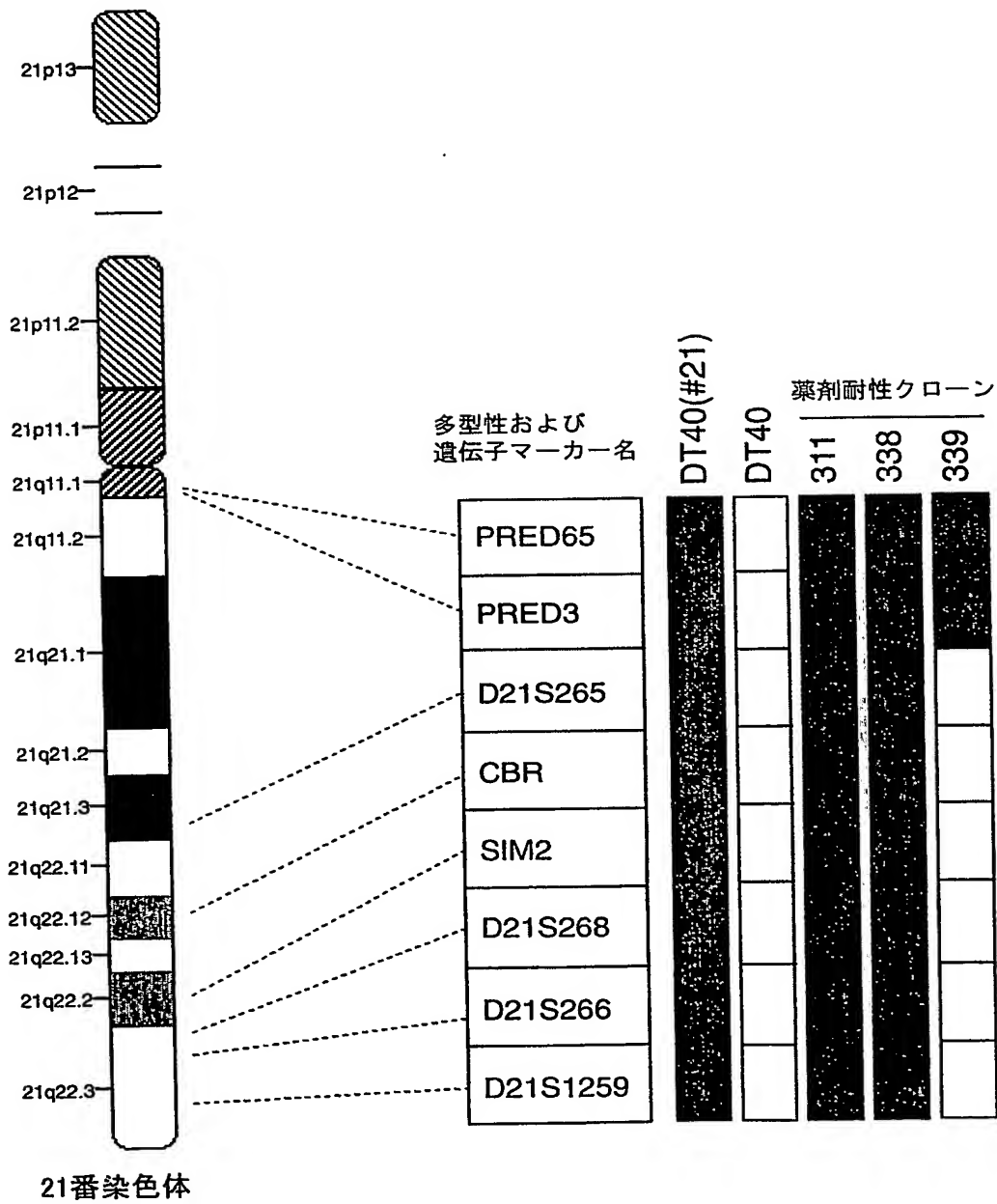




図3

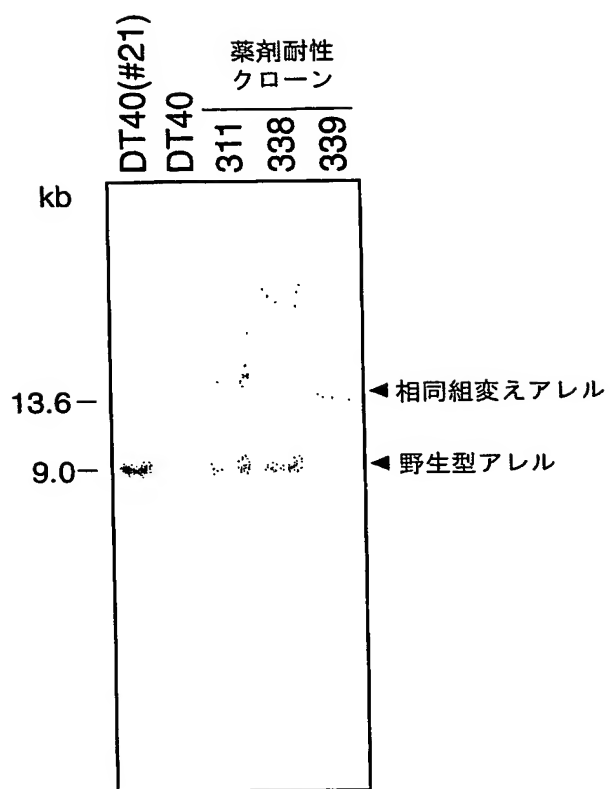


図4

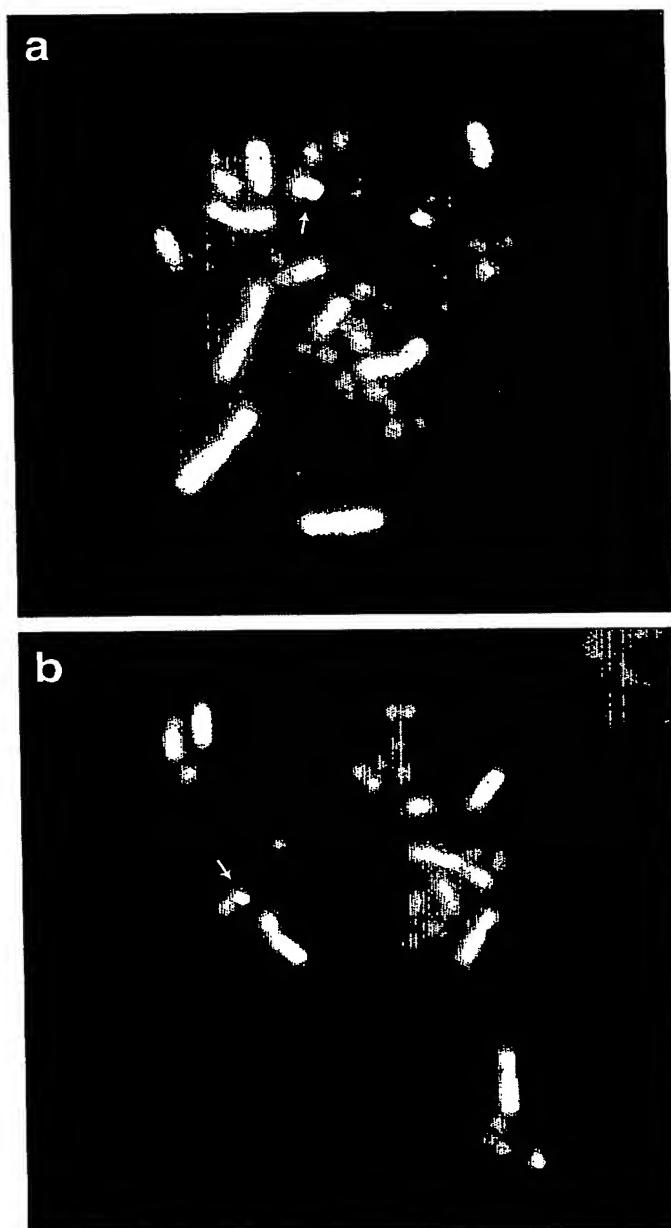
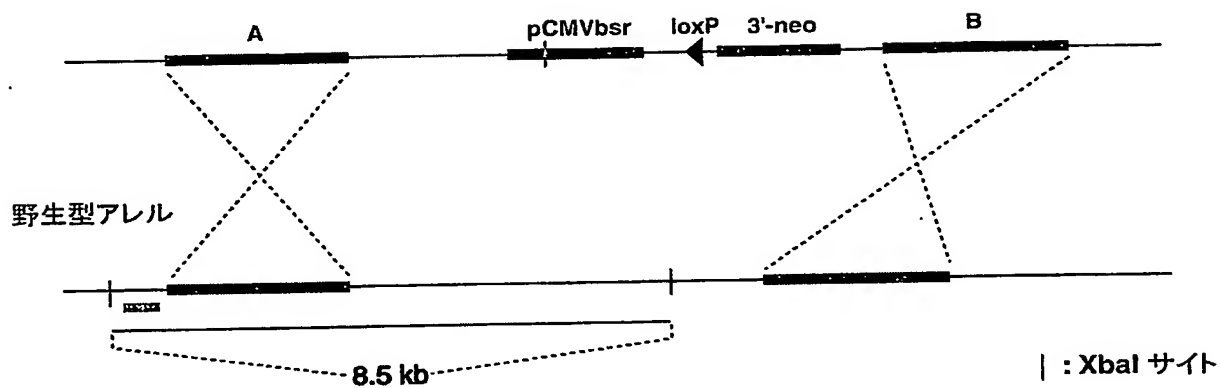


図5

ターゲティングベクター



↓  
DT40における相同組換え

ターゲティングされたアレル

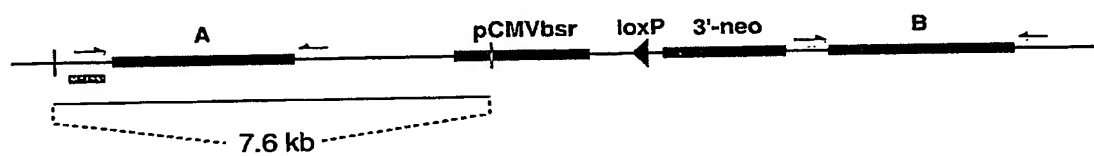


図6

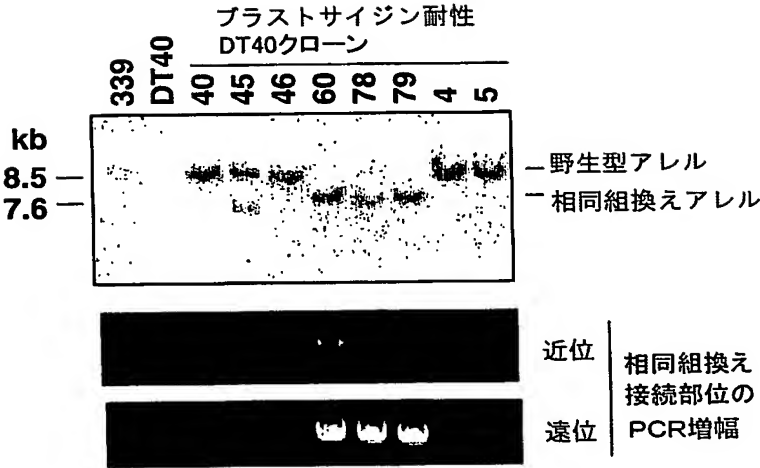


図7

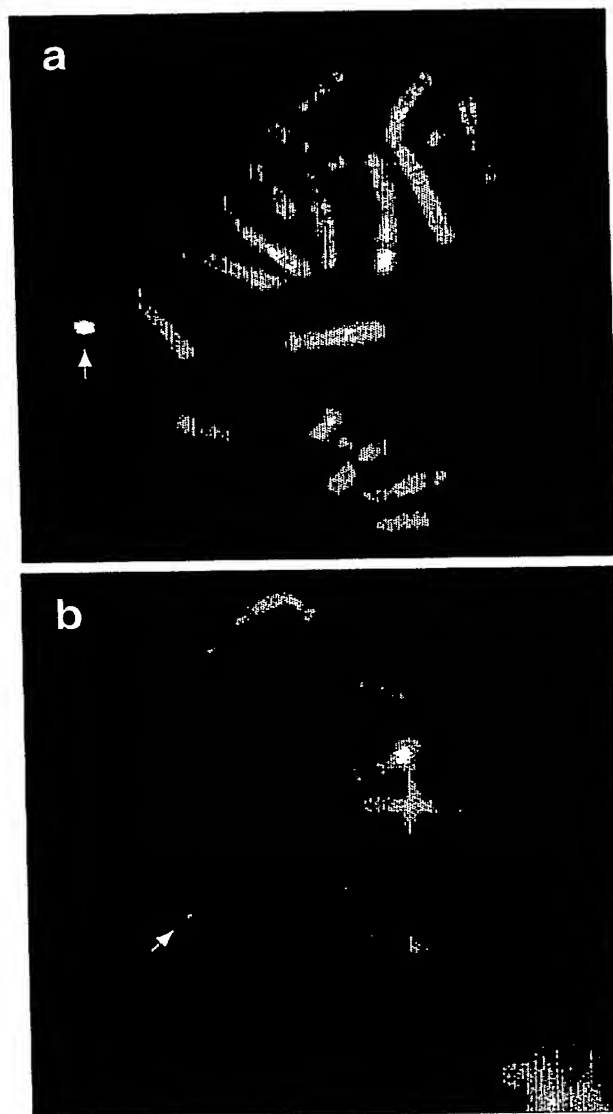


図8

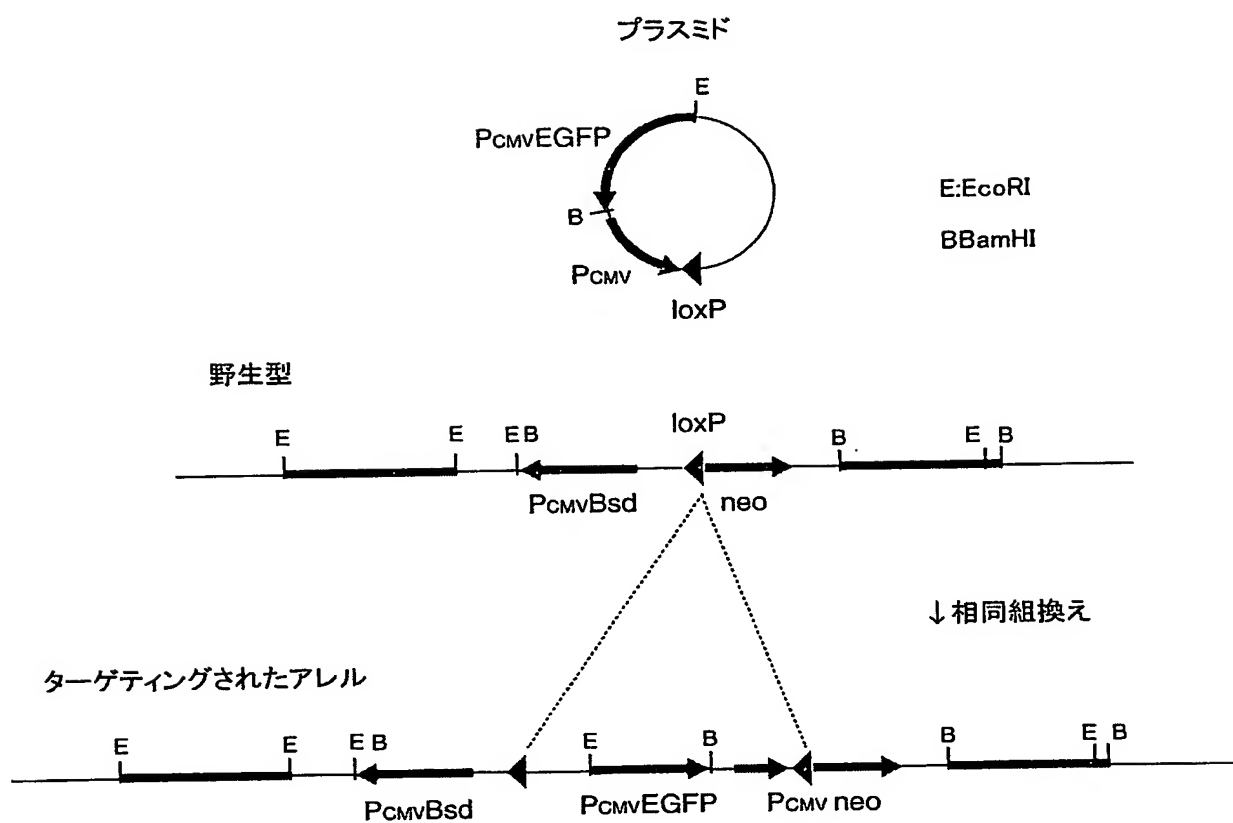


図9

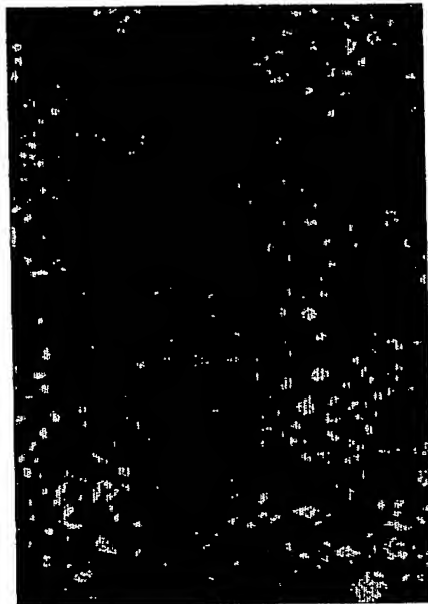


図10

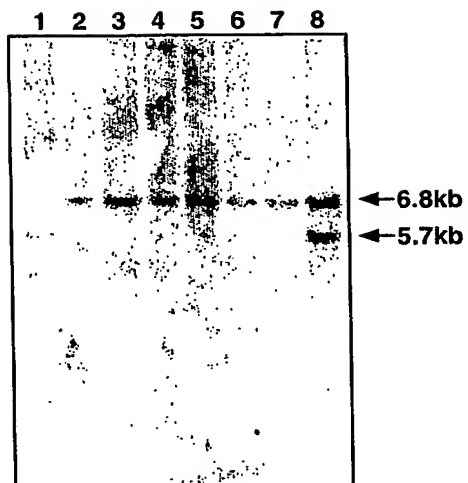




図 11

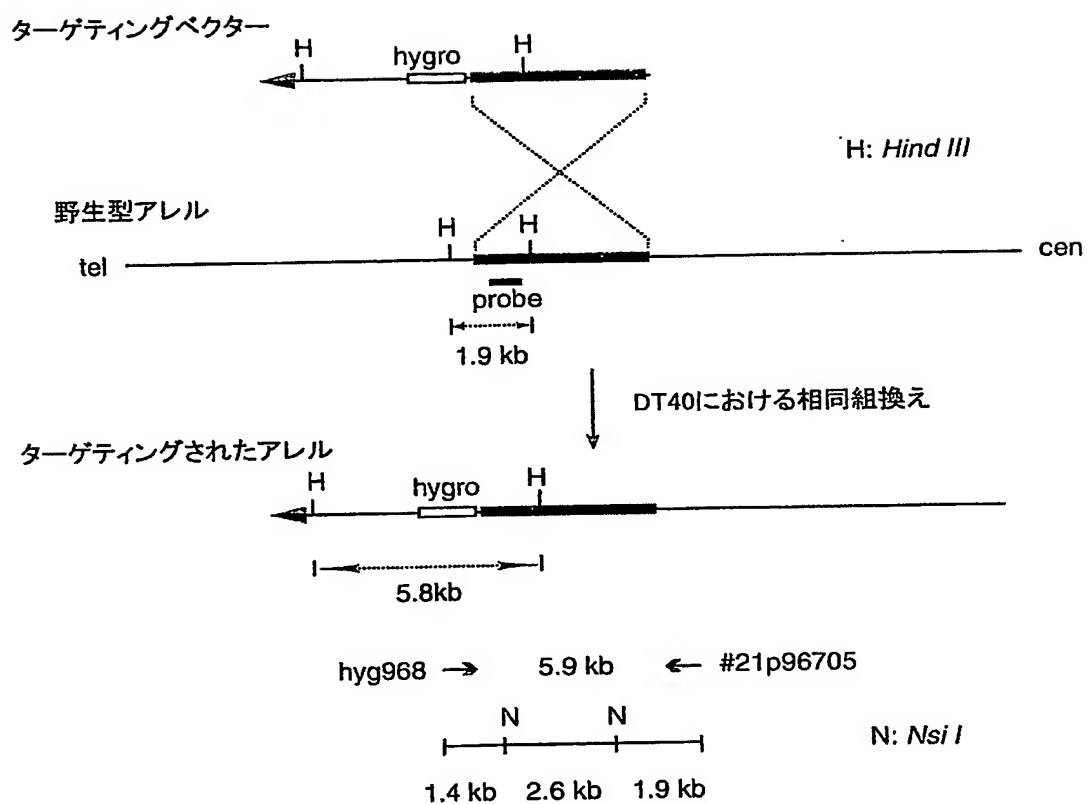


図12

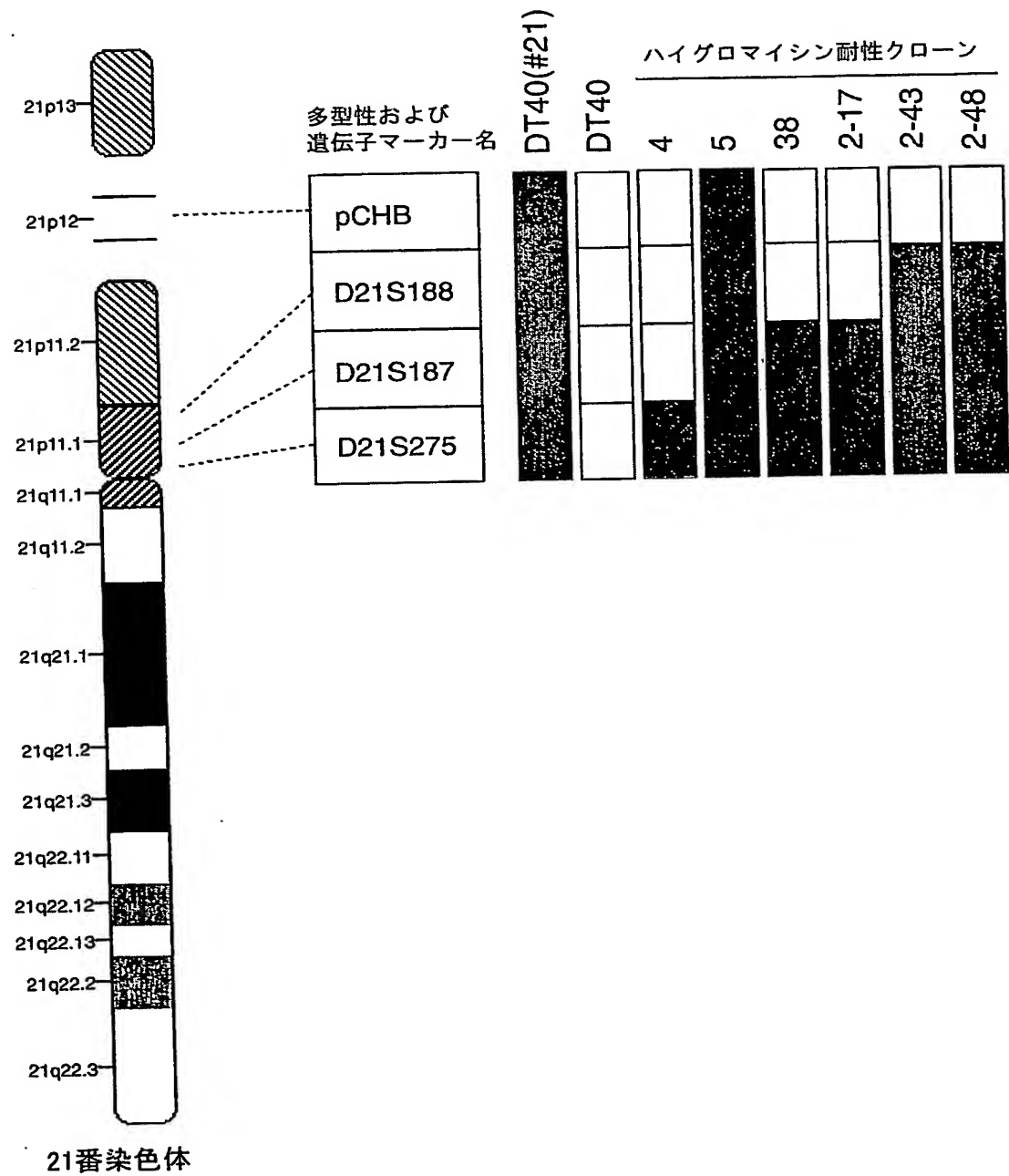


図 13

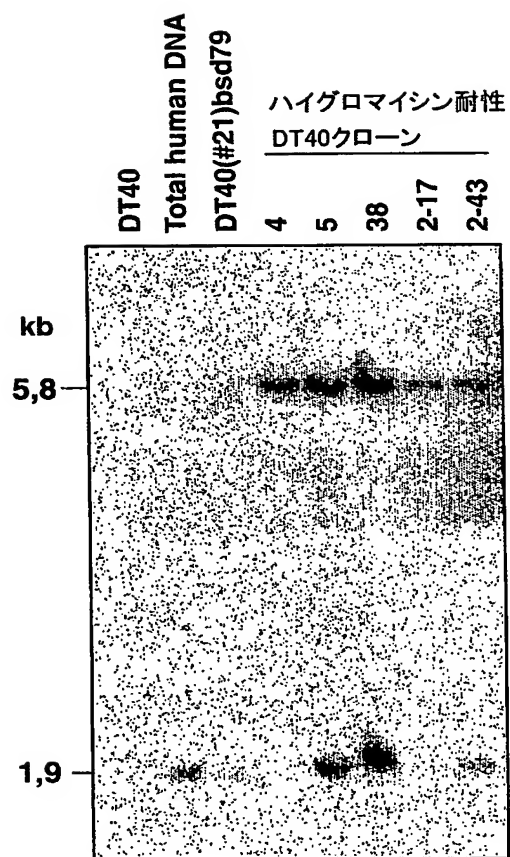


図 14

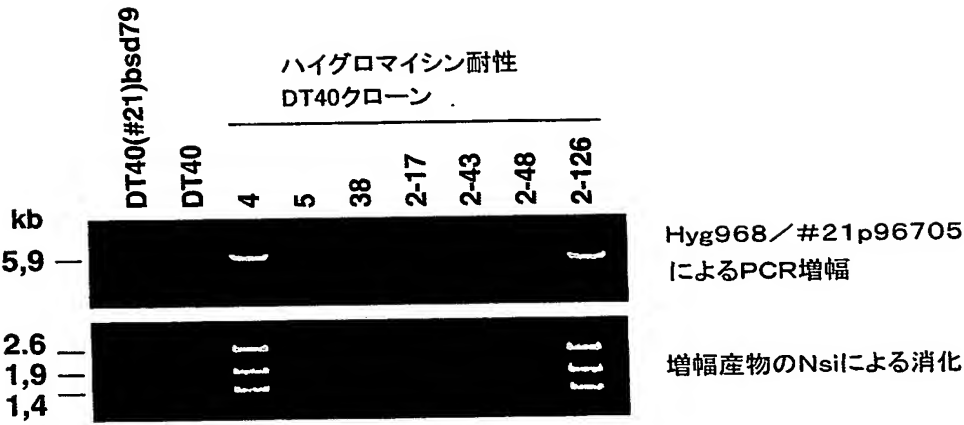


図15

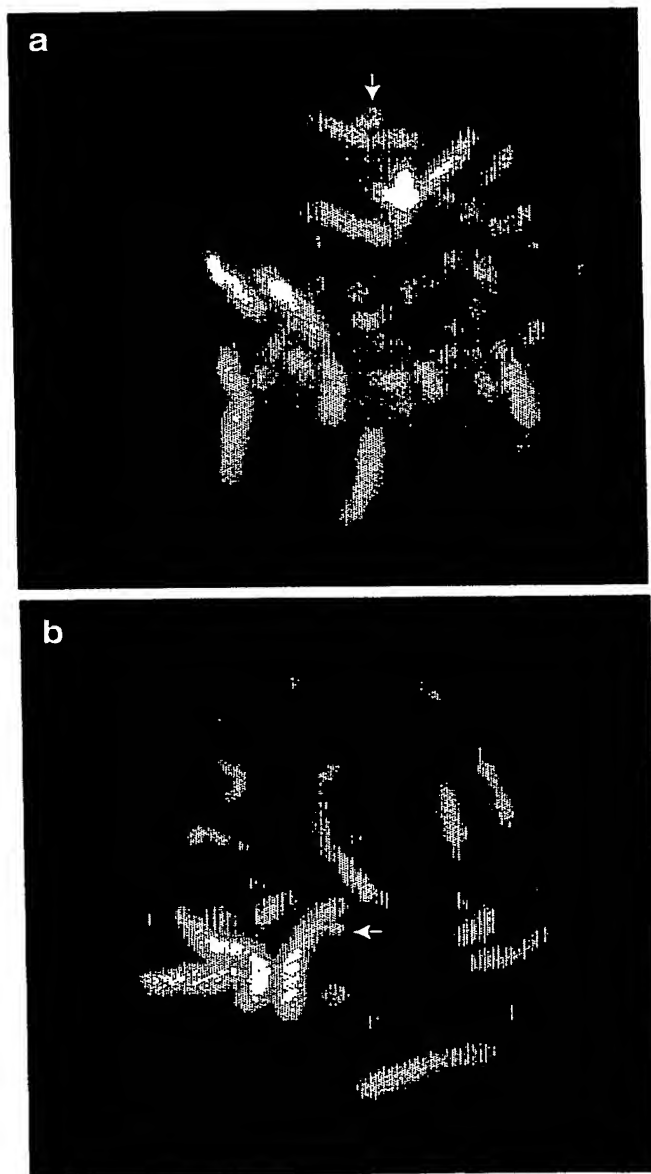


図 16

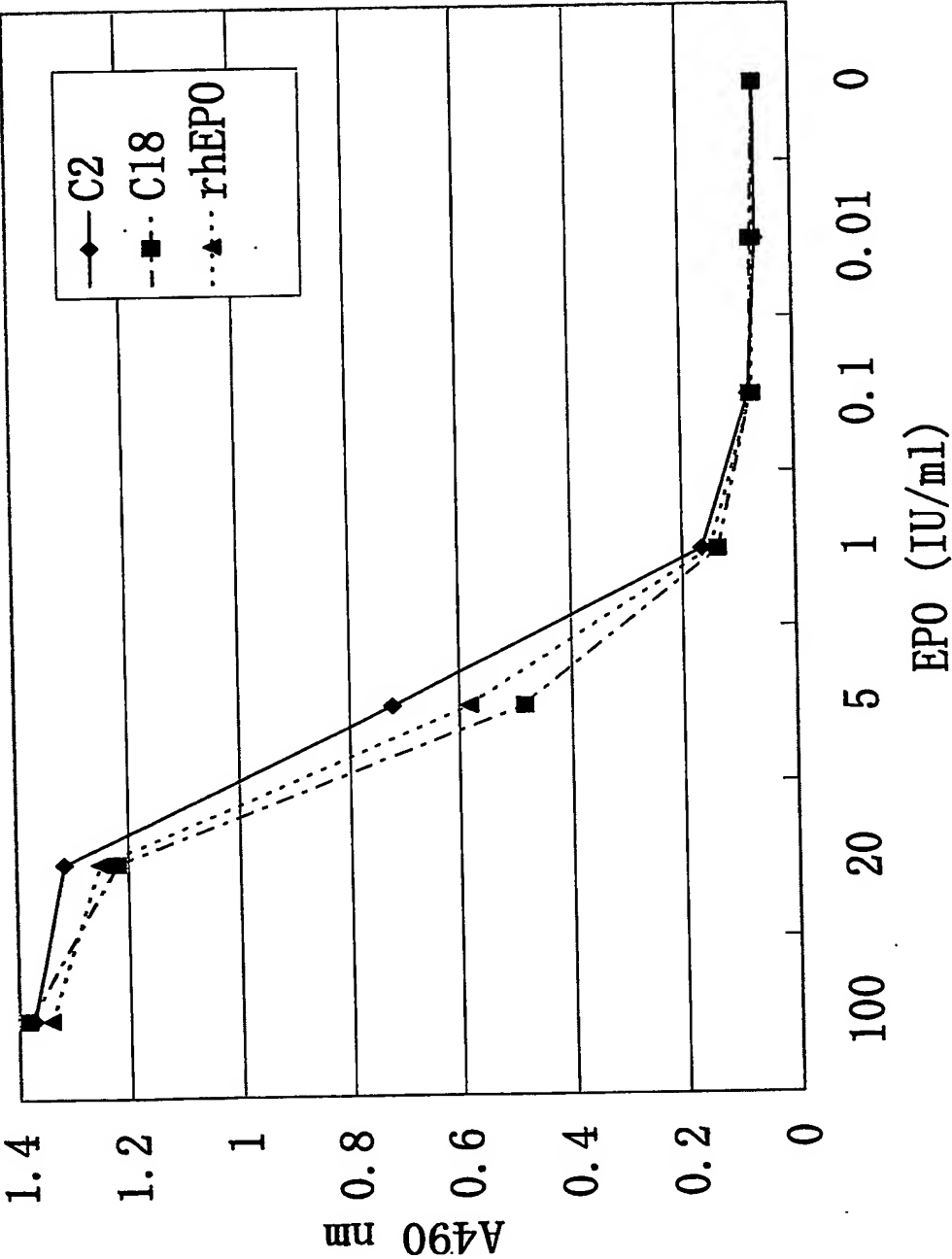


図17

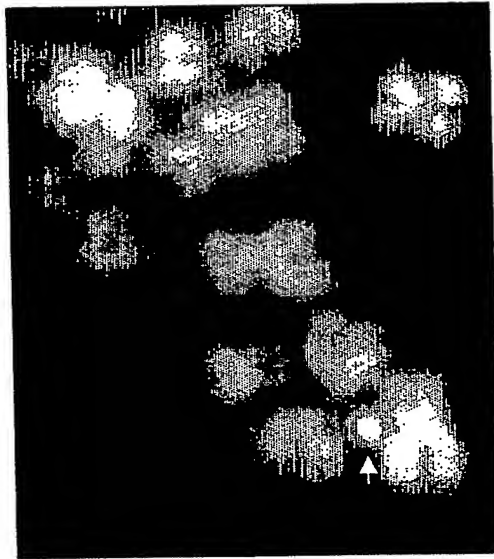


図18

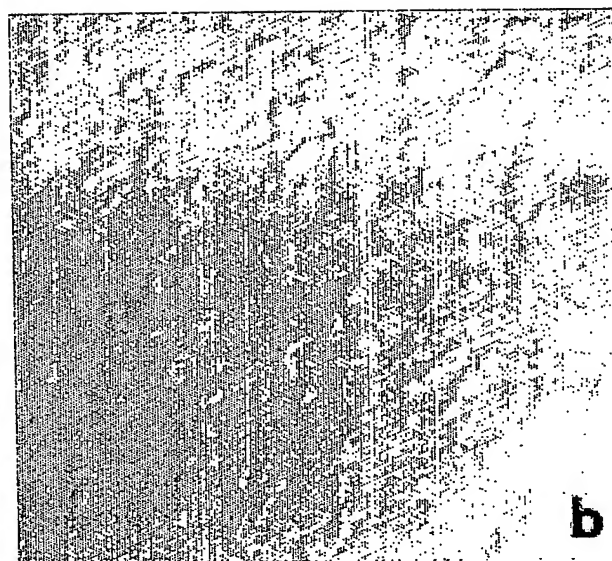
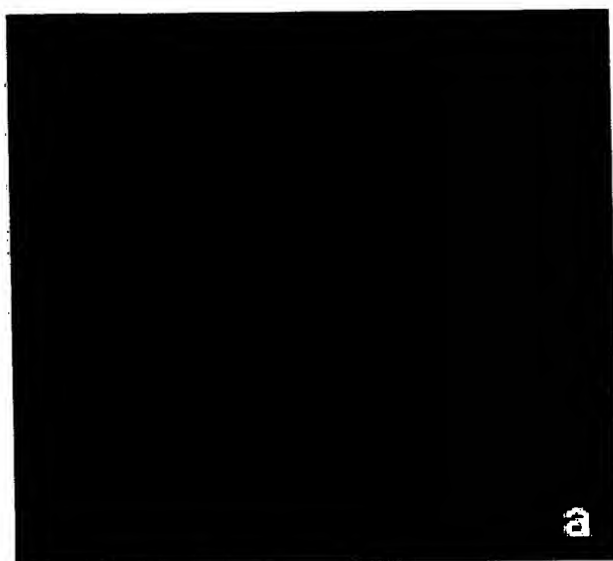




図 19

ミクロセル融合株										
P C R マーカ－	CHO(#21)	E14(#21)neo					CHO(#21E14(#21)Hyg			
	ΔqGFP#7.	1	11	13	14	20	Hyg8	1	2	
PCHB	+	+	—	—	+	+	—			
D21S187	+	+	—	—	—	—	—			
#21p76957/ 77555	+	+	—	—	—	—	—			
HygroF/ HygroR	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Hyg968/ #21p96705	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
#21p91203/ 91976	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+
Spe31203/Bam36192	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+
D21S275	+	+	—	—	+	+	+	—		
<centromere>										
PRED65F/ PRED65R	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—
PRED3F/ PRED3R	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+
#21qEcoF/#21qEcoR	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+
Left455F/ Left638R	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+
Right958F/ Right1152	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+
#21qBaF/#21qBaR	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+

図20

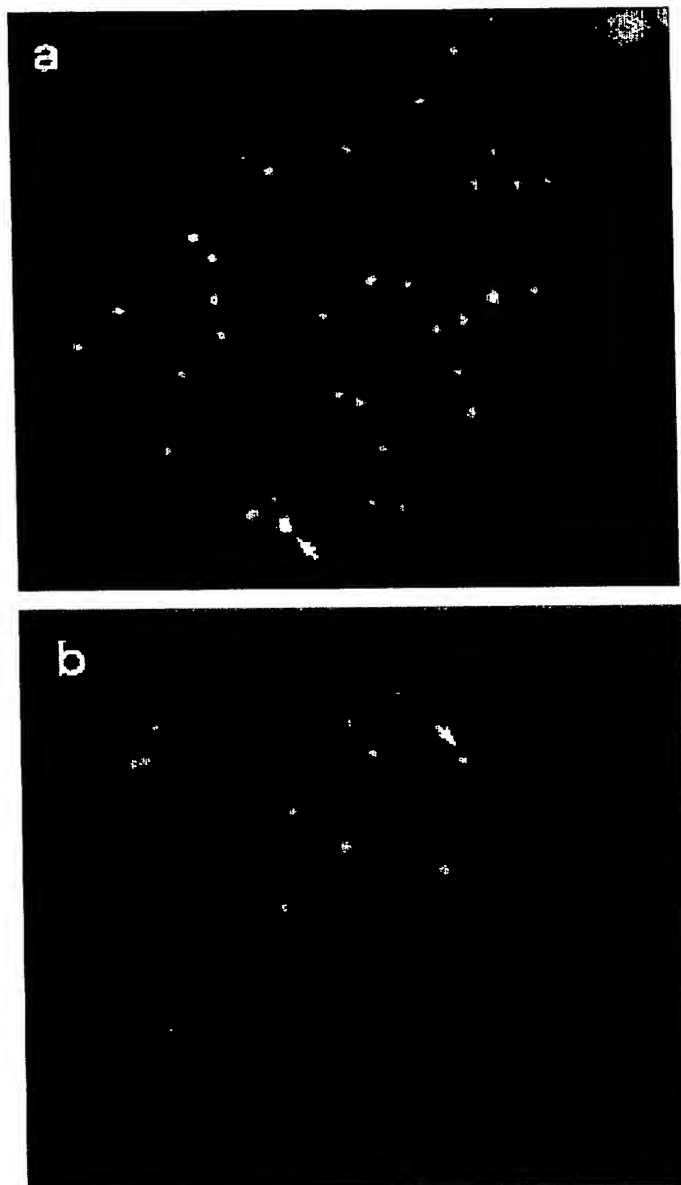


図21

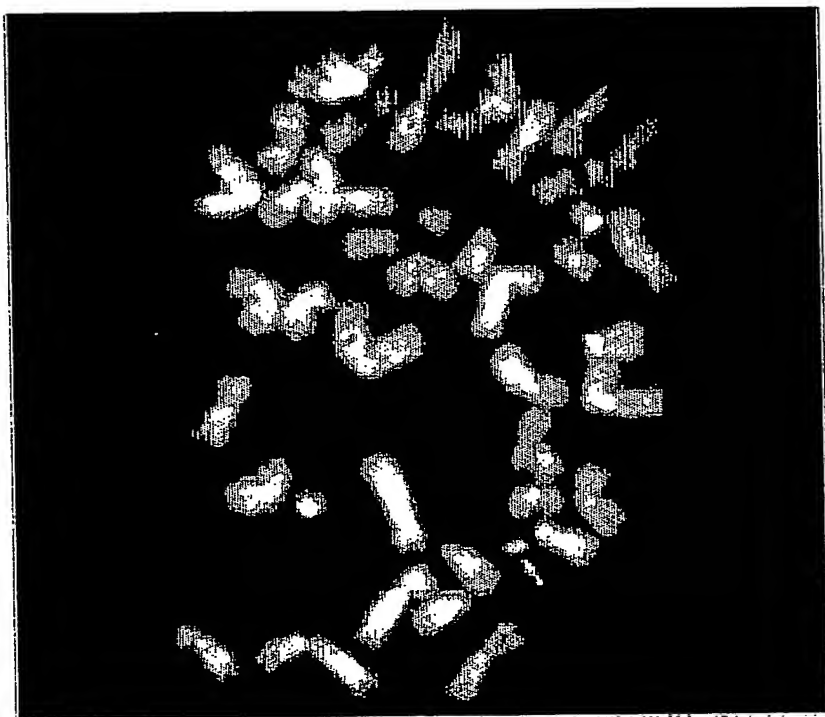
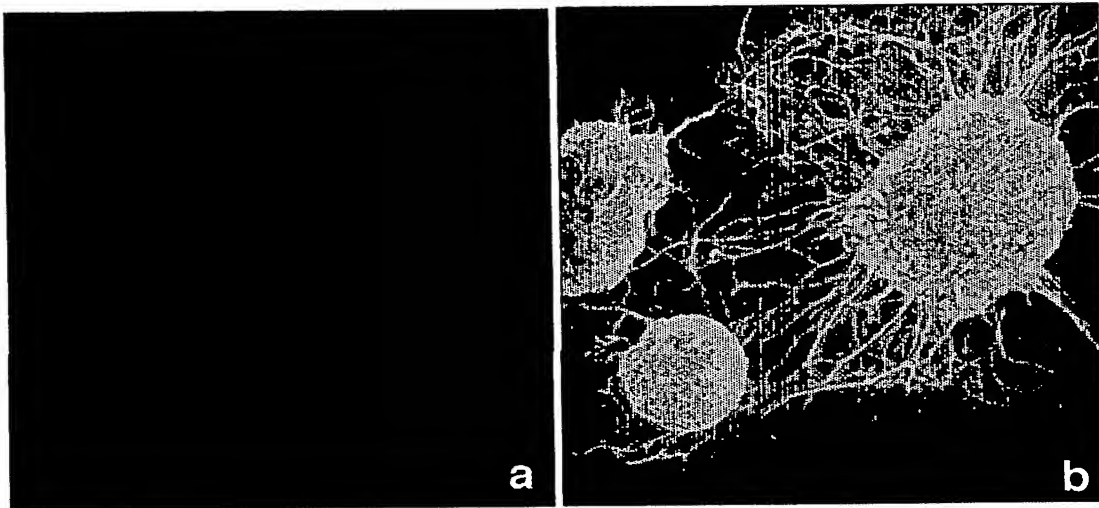


図22



## SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> Human Artificial Chromosome Vector

<130> PH-1899-PCT

<150> JP 2002-292853

<151> 2002-10-04

<160> 62

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 1

cgcggatcca gagagagcct ggaatgcctg gtagtgt

37

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 2

cgcggatccc cagtgccctg agatcttggtg atttctc

37

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 3

gcctggcatc ttcctcaata

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 4

ttgcatgcct gtggtactgt

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 5

tcacaatcat gggctttgaa

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 6

cacgcaacca ttgttcatt

20

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 7  
tcacagccag cagaggattc

20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 8  
cacctgcaca atggctcaac

20

<210> 9  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 9  
ccggaattcc tctgggtttc tggatgaagc

29

<210> 10  
<211> 29  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 10

ccggaattct gtagatcctg ccattgtgg

29

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 11

cgcggatcct tggctccaaa aggtaccac

29

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 12

cgcggatccc tatcctcgcc actgtgtcc

29

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 13



## SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> Human Artificial Chromosome Vector

<130> PH-1899-PCT

<150> JP 2002-292853

<151> 2002-10-04

<160> 62

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 1

cgcggatcca gagagagcct ggaatgcctg gtagtgt

37

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 2

cgcggatccc cagtgccctg agatcttggtg atttctc

37

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 3

gcctggcatc ttcctcaata

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 4

ttgcatgcct gtggtactgt

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 5

tcacaatcat gggctttgaa

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 6

cacgcaacca ttgttcatt

20

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 7  
tcacagccag cagaggattc

20

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 8  
cacctgcaca atggctcaac

20

<210> 9  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 9  
ccggaattcc tctgggtttc tggatgaagc

29

<210> 10  
<211> 29  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 10

ccggaattct gtagatcctg ccattgtgg

29

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 11

cgcggaatcct tggctccaaa aggtaccac

29

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 12

cgcggaatccc tatcctcgcc actgtgtcc

29

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 13

gttcagaaa agtagactgt agcaa

25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 14

tctaaggaac aaatctaggt catgg

25

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 15

gggctagcca ttaaagctga

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 16

aaagggaata agggcgacac

20

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 17

ggtttgtcca aactcatcaa tgta

24

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 18

gtcaattcac taattcctat tcccagt

27

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 19

caacagcatc cccatctctg

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 20

gctcaagatg cccctgttct

20

<210> 21  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 21  
ggccgaattc cgtattaccg ccatgcat

28

<210> 22  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 22  
ccgggatccc acaactagaa tgcagtg

27

<210> 23  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 23  
gcactagtct ggcactcctg cataaaca

28

<210> 24  
<211> 30  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 24

ctaaggatcc atttcagcct gtgggaatca

30

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 25

ctggcactcc tgcataaaca

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 26

tctgtgttcc ccttctctga

20

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 27



aagtactcgc cgatagtgga aacc

24

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 28

agtttagccta ccttttggcc atcc

24

<210> 29

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 29

cgggatccct cgagcgagac atgataagat acattgatg

39

<210> 30

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 30

ggaagatctt cctaadcagc cataccacat ttgtagagg

39

<210> 31

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 31

cggaattccg gacattgatt attgactagt tattaatag

39

<210> 32

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 32

cgggatcccg ggtgtcttct atggaggatca aaacag

36

<210> 33

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 33

cgggatcccg gccaccatgg gggatgcacga atgtc

35

<210> 34

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 34

cgctcgagcg ctatctgtcc cctgtcctgc agg

33

<210> 35  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 35  
ggaattccgg gccacgcgt gacattgatt attga

35

<210> 36  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 36  
ggaattcctg atcataatca gccataccac atttg

35

<210> 37  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 37  
tttgcattgc tttagttcta tgatga

26

<210> 38  
<211> 23  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 38

aggtcgtct tgacaaaaag aac

23

<210> 39

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 39

caggaaacag ctatgac

17

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 40

tttgcattgtc tttagttcta tgatga

26

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 41

aggtcgggtct tgacaaaaag aac

23

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 42

ctaccggtga tattgctgaa gag

23

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 43

atttgactg ccggtagaac t

21

<210> 44

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 44

ctgctgcgca cgtgggaag

19

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 45

ggtctggcag gtgacaccac

20

<210> 46

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 46

gaagatcttc atcgatcggc caccatgccg cgcgc

35

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 47

tcactcggtc cacgcgtcct

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 48

agtgccagcc gaagtctgcc

20

<210> 49  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 49  
gcagctgaac agtgccttc

19

<210> 50  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 50  
aggacgcgtg gaccgagtga

20

<210> 51  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 51  
ccatcctaatac gactcact atagggc

27

<210> 52  
<211> 35  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 52

ccgagcgtct cacctcgagg gtgaaggcac tgttc

35

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 53

atggactacg tcgtgggagc caga

24

<210> 54

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 54

gtcgacgcta gctcagtcga ggatggtctt gaagt

35

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 55



gcgaagaatc tcgtgctttc

20

<210> 56  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 56  
ataggtcagg ctctcgctga

20

<210> 57  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 57  
gccatccacg ctgttttgac

20

<210> 58  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic oligonucleotide

<400> 58  
gcatcagagc agccgattgt

20

<210> 59  
<211> 22  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 59

acacttttga caaacacacc ag

22

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 60

tcaacaatga aaggggatgt c

21

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 61

tgaatgaact gcaggacgag

20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic oligonucleotide

<400> 62

atactttctc ggcaggagca

20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/12734

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C21N1/21, C12N5/10,  
C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C21N1/21, C12N5/10,  
C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KUROIWA, Y. et al., Efficient modification of a human chromosome by telomere-directed truncation in high homologous recombination-proficient chicken DT40 cells., Nucleic.Acids.Res., 15 July, 1998 (15.07.98), Vol.26, No.14, pages 3447 to 3448	1-48
Y	KUROIWA, Y. et al., Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts., Nat.Biotechnol., 2000, October, Vol.18, No.10, pages 1086 to 1090	1-48
Y	KUROIWA Y. et al., Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin., Nat.Biotechnol., 2002, September, Vol.20, No.9, pages 889 to 894	1-48



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 December, 2003 (22.12.03)Date of mailing of the international search report  
20 January, 2004 (20.01.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

T/JP03/12734

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Mills W. et al., Generation of an approximately 2.4 Mb human X centromere-based minichromosome by targeted telomere-associated chromosome fragmentation in DT40., Hum.Mol.Genet., 1999, May, Vol.8, No.5, pages 751 to 761	1-48
Y	Larin Z. et al., Advances in human artificial chromosome technology., Trends.Genet., 2002, June, Vol.18, No.6, pages 313 to 319	1-48
Y	IKENO M. et al., Generation of human artificial chromosomes expressing naturally controlled guanosine triphosphate cyclohydrolase I gene., Genes Cells., 02 October, 2002 (02.10.02), (online publication date: 27 September, 2002 (27.09.02)), Vol.7, No.10, pages 1021 to 1032	1-48
Y	Grimes BR, et al., Alpha-satellite DNA and vector composition influence rates of human artificial chromosome formation., Mol.Ther., 2002, June, Vol.5, No.6, pages 798 to 805	1-48
Y	Hiroshi MASUMOTO et al., "Centromere-Kinetochore no Kino Kozo Hito Jinko Senshokutai o Mochiita Kino Kaiseki", Protein, Nucleic acid and Enzyme, 1999, Vol.44, No.2, pages 1665 to 1673	1-48
A	TOMIZUKA K. Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies., Proc.Natl. Acad.Sci., USA., 18 January, 2000 (18.01.00), Vol.97, No.2, pages 722 to 727	1-48
A	Yang JW. et al., Human mini-chromosomes with minimal centromeres., Hum.Mol.Genet., 22 July, 2000 (22.07.00), Vol.9, No.12, pages 1891 to 1902	1-48
P,Y	Robl JM. et al., Artificial chromosome vectors and expression of complex proteins in transgenic animals., Theriogenology., 01 January, 2003 (01.01.03), Vol.59, No.1, pages 107 to 113	1-48

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PubMed, BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kuroiwa Y, et al., Efficient modification of a human chromosome by telomere-directed truncation in high homologous recombination-proficient chicken DT40 cells. Nucleic Acids Res. 1998.07.15, vol.26, no.14, p.3447-3448.	1-48
Y	Kuroiwa Y, et al., Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts. Nat Biotechnol. 2000. Oct, vol.18, no.10, p.1086-1090.	1-48

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.12.03

国際調査報告の発送日

20.1.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kuroiwa Y, et al., Cloned transchromosomic calves producing human immunoglobulin. Nat Biotechnol. 2002 Sep, vol.20, no. 9, p. 889-894.	1 - 4 8
Y	Mills W, et al., Generation of an approximately 2.4 Mb human X centromere-based minichromosome by targeted telomere-associated chromosome fragmentation in DT40. Hum Mol Genet. 1999 May, vol.8, no.5, p. 751-761.	1 - 4 8
Y	Larin Z, et al., Advances in human artificial chromosome technology. Trends Genet. 2002 Jun, vol.18, no.6, p. 313-319.	1 - 4 8
Y	Ikeno M, et al., Generation of human artificial chromosomes expressing naturally controlled guanosine triphosphate cyclohydrolase I gene. Genes Cells. 2002.10.02 (online publication date: 2002.09.27), vol.7, no.10, p.1021-1032.	1 - 4 8
Y	Grimes BR, et al., Alpha-satellite DNA and vector composition influence rates of human artificial chromosome formation. Mol Ther. 2002 Jun, vol.5, no.6, p. 798-805.	1 - 4 8
Y	舩本寛他, セントロメア・キネトコアの機能構造 ヒト人工染色体を用いた機能解析. 蛋白質・核酸・酵素. 1999, vol.44, no.2, p.1665-1673	1 - 4 8
A	Tomizuka K, Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000.01.18, vol.97, no.2, p. 722-727.	1 - 4 8
A	Yang JW, et al., Human mini-chromosomes with minimal centromeres. Hum Mol Genet. 2000.07.22, vol.9, no.12, p. 1891-1902.	1 - 4 8
P Y	Robl JM, et al., Artificial chromosome vectors and expression of complex proteins in transgenic animals. Theriogenology. 2003.01.01, vol.59, no.1, p. 107-113.	1 - 4 8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**